

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO



FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

“ESTUDIO DE LA VIABILIDAD DE CRECIMIENTO DEL HONGO *Pleurotus*

***ostreatus* APLICADO EN INÓCULO LÍQUIDO PARA USO EN**

BIORREMEDIACIÓN.”

TESIS DE GRADO

PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

PRESENTADO POR

CRISTIAN ANDRÉS CHUQUÍN ENRÍQUEZ

RIOBAMBA-ECUADOR

2012

AGRADECIMIENTO

A Dios por darme la salud y por poner retos en mi vida para poder superarlos y ser una mejor persona cada día.

A mis padres Nelson Chuquín, Rita Enríquez, por su apoyo incondicional y su confianza, por haberme educado con los valores más preciados para mí.

A las personas importantes en mi vida a las que volví a encontrar luego de años de no haber visto y que se han convertido en Amigos muy valiosos.

A la ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DE CHIMBORAZO, a la Facultad de Ciencias, a sus profesores quienes con sus enseñanzas, acogida y amistad impulsaron mi carrera.

De manera muy especial a la Dra. Nancy Veloz Directora de Tesis; por la confianza depositada en mí y su colaboración para el desarrollo de esta investigación.

Al Dr. Roberto Erazo que con su valioso aporte contribuyo para el desarrollo de este trabajo.

Al personal del LABCESTA por sus consejos y apoyo brindados para sacar adelante este proyecto.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de manera muy especial a mis padres y mi hermana que con su amor han apoyado mi carrera y con su consejo he logrado superar cada reto de esta gran experiencia de la vida estudiantil.

A todos aquellos Amigos que con su compañía y con su competencia leal han logrado hacer de esta etapa una de las más especiales de mi vida.

Por el esfuerzo al triunfo.

Cristian Chuquín

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

El Tribunal de Tesis certifica que: El trabajo de investigación: **“ESTUDIO DE LA VIABILIDAD DE CRECIMIENTO DEL HONGO *Pleurotus ostreatus* APLICADO EN INÓCULO LÍQUIDO PARA USO EN BIORREMEDIACIÓN.”**, de responsabilidad del señor egresado: Cristian Andrés Chuquín Enríquez ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

NOMBRE	FIRMA	FECHA
Dr. Silvio Álvarez DECANO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS	_____	_____
Dra. Nancy Veloz DIRECTORA DE LA ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS	_____	_____
Dra. Nancy Veloz DIRECTOR DE TESIS	_____	_____
Dr. Roberto Erazo MIEMBRO DEL TRIBUNAL	_____	_____
Dr. Fausto Yaulema MIEMBRO DEL TRIBUNAL	_____	_____
Sr. Carlos Rodríguez DIRECTOR DEL CENTRO DE DOCUMENTACIÓN	_____	_____
NOTA DE TESIS ESCRITA	_____	

“Yo Cristian Andrés Chuquín Enríquez soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis, y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado pertenecen a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Cristian Andrés Chuquín Enríquez

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Cd	Cadmio
g	Gramos
g/L	gramos por litro
HAP's	Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos
HPLC	High performance Liquid Chromatography Cromatografía líquida de alta eficiencia
Kg	Kilogramo
Ni	Níquel
Pb	Plomo
pH	Potencial Hidrógeno
T1	Tratamiento 1
T2	Tratamiento 2
TPH's	Hidrocarburos Totales de Petróleo
U1	Unidad 1
U2	Unidad 2
U3	Unidad 3
°C	Grados Celsius

ÍNDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTO	2
DEDICATORIA	3
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	6
ÍNDICE DE CONTENIDOS	7
ÍNDICE DE FIGURAS	10
ÍNDICE DE TABLAS	11
ÍNDICE DE GRAFICOS	13
ÍNDICE DE FOTOS	14
ÍNDICE DE ANEXOS.....	15
RESUMEN.....	17
SUMMARY	19
INTRODUCCIÓN	20
OBJETIVO GENERAL:	21
OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	22
CAPÍTULO I.....	23
1. MARCO TEÓRICO.....	23
1.1 BIORREMEDIACIÓN	23
1.2 ATENUACIÓN NATURAL	27
1.3 APLICACIONES DE HONGOS EN TRATAMIENTOS DE BIODESCONTAMINACIÓN	27
1.4 CARACTERÍSTICAS DE <i>PLEUROTUS</i> Y HONGOS BASIDIOMICETOS EN BIORREMEDIACIÓN	28
1.4.1 UBICACIÓN TAXONÓMICA DEL HONGO <i>Pleurotus ostreatus</i>	28
1.4.2 FORMA DE NUTRICIÓN	29
1.4.3 CRECIMIENTO MICELIAL	30
1.4.4 IMPORTANCIA DEL CULTIVO LÍQUIDO DEL MICELIO.....	30
1.4.5 CONTAMINANTES	31
CAPITULO II	34

2.	MATERIALES Y MÉTODOS	34
2.1	LUGAR DE LA INVESTIGACIÓN	34
2.2	MATERIALES UTILIZADOS.....	34
	Suelo Contaminado	34
	Material biológico	35
	Sustratos	35
2.3	MUESTREO	36
2.3.1	Método de Muestreo	36
2.3.2	Tamaño de la Muestra.....	37
2.4	METODOLOGIA	38
2.5	DISEÑO EXPERIMENTAL	39
	TIPO DE DISEÑO.....	39
	Tratamientos.....	42
	Parámetros de control.....	43
	Parámetros de medición	43
2.6	MÉTODOS	43
CAPITULO III.....		45
3.	PARTE EXPERIMENTAL	45
3.1	REACTIVACIÓN DEL MICELIO <i>Pleurotus ostreatus</i>	45
3.2	PREPARACIÓN DE SUSTRATOS LÍQUIDOS	46
3.3	PRUEBA DE CRECIMIENTO MICELIAL DE LÍQUIDO A SÓLIDO	52
3.4	DETERMINACIÓN DE BIOMASA EN MEDIO LÍQUIDO.....	52
	Pesos de suelos.....	53
3.5	DISPOSICIÓN E INOCULACIÓN DE SUELOS EN LAS UNIDADES EXPERIMENTALES	54
3.6	MUESTREO EN EL LABORATORIO	54
3.7.1	DETERMINACIÓN DE METALES PESADOS (Cd, Ni, Pb).....	55
3.7.2	DETERMINACIÓN DE HIDROCARBUROS TOTALES DE PETRÓLEO....	57
3.7.3	DETERMINACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS 58	
3.7.4	DETERMINACIÓN DE pH	59
CAPITULO IV.....		61
4.	RESULTADOS.....	61

4.1.	FORMULACIÓN DE LOS SUSTRATOS LÍQUIDOS DONDE SE PUEDA DESARROLLAR EL HONGO CON LOS NUTRIENTES NECESARIOS	61
4.2.	SELECCIÓN DEL MEJOR SUSTRATO DE ACUERDO A LAS CARACTERÍSTICAS DE CRECIMIENTO QUE SE OBTENGA.....	62
4.3.	CARACTERIZACION DEL SUELO CONTAMINADO	69
4.3.2	Caracterización inicial del suelo	69
4.4.	BIORREMEDIACION DEL SUELO CONTAMINADO CON LOS INÓCULOS LÍQUIDOS DE <i>Pleurotus ostreatus</i>	71
4.4.1	PRUEBA PRELIMINAR SIEMBRA DE INOCULO LÍQUIDO EN CAJAS CON AGAR PREVIO A INOCULAR EN EL SUELO	71
4.5	SEGUIMIENTO DE LAS VARIABLES DE CONTROL	75
4.5.1	TEMPERATURA Y HUMEDAD AMBIENTAL.....	75
4.5.2	TEMPERATURA Y HUMEDAD EN TRATAMIENTOS Y TIEMPO DE BIORREMEDIACION	76
4.5.3	pH EN TRATAMIENTOS DE BIORREMEDIACION.....	78
4.7	PORCENTAJE DE EFICACIA DEL PROCESO DE BIORREMEDIACION	82
4.7.1	TPH.....	82
CAPITULO V	90
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	90
CONCLUSIONES	90
RECOMENDACIONES	92
BIBLIOGRAFÍA	94
ANEXOS	96

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Biorremediación	23
Figura 2: Disposición de Tratamientos y unidades experimentales	42
Figura 3: Semilla y Repique de Hongo <i>Pleurotus ostreatus</i>	46
Figura 4: Sustrato A.....	48
Figura 5: Sustrato AP.....	48
Figura 6: Sustrato C	49
Figura 7: Sustrato E	49
Figura 8: Sustratos T, TP, TPE.....	50
Figura 9: Sustratos Ar&ArE	51
Figura 10: Significancia de las Variables en el estudio de viabilidad	63
Figura 11. Nivel de Confianza al 95%	64
Figura 12. Análisis estadístico para T1 y T2	85
Figura 13. Nivel de Confianza al 95 % en análisis de tratamientos para TPH.....	86

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I: Descripción abreviaturas	36
Tabla II; Diseño de la Investigación	39
Tabla III: Numero de sustratos.....	40
Tabla IV: Descripción de Tiempos	40
Tabla V. Métodos de Análisis.....	43
Tabla VI: Aceptación de la preparación de sustratos.....	61
Tabla VII: Medición de biomasa generada en los sustratos en diferentes tiempos.....	62
Tabla VIII: Resultados Sustratos, Tiempos, Biomasa y Aptitud	65
Tabla IX: Caracterización del suelo a tratar, parámetros tabla 6 RAOHE.....	69
Tabla X. Límites permisibles para la identificación y remediación de suelos contaminados en todas las fases de la industria hidrocarburífera, incluidas las estaciones de servicios.	70
Tabla XI: Siembra a los 2 días de hacer el inóculo líquido.....	72
Tabla XII: Siembra a los 6 días de hacer el inóculo líquido	73
Tabla XIII: pH durante el experimento Tratamientos 1 y 2	79
Tabla XIV: Resultados de parámetros analizados al mes de tratados con inóculo líquido.....	80

Tabla XV: Resultados de parámetros analizados al final de realizada la biorremediación.....	81
Tabla XVI: Eficiencia TPH's.....	83
Tabla XVII: Eficiencia HAPs	87

ÍNDICE DE GRAFICOS

Gráfico 1: Sustratos que presentaron el mejor desarrollo de los pellets	68
Gráfico 2: Porcentaje de crecimiento en cajas Petri de inóculo de dos días	72
Gráfico 3: Porcentaje de crecimiento en cajas Petri de inóculo de seis días	73
Gráfico 4: Variación de Temperatura durante la investigación	75
Gráfico 5: Variación de la Humedad durante la Investigación.....	76
Gráfico 6: Temperaturas de las Unidades experimentales.....	77
Gráfico 7: Porcentaje de Humedad de las Unidades Experimentales.....	78
Gráfico 8: pH de los Tratamientos 1 y 2.....	79
Gráfico 9: Variación de TPH al mes de iniciado el proceso de biorremediación.....	80
Gráfico 10. Resultado de TPH al final del proceso de biorremediación	82
Gráfico 11. Porcentaje de Eficacia en la biodegradación del parámetro TPH	84
Gráfico 15: Variación de HAPs en las unidades experimentales	87
Gráfico 16: Variación de Cadmio en unidades experimentales.....	88
Gráfico 17: Variación de Níquel en las unidades experimentales	89
Gráfico 18: Variación de Plomo en las Unidades experimentales.....	89

ÍNDICE DE FOTOS

Fotografía 1. Sustrato de Avena con desarrollo de pellets	68
Fotografía 2: Prueba de Siembra Líquida en cajas con Agar	74
Fotografía 3: Cajas invadidas totalmente con Micelio de <i>Pleurotus ostreatus</i> sembrado en inóculo líquido.	74

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Caja Petri con Cultivo Puro de <i>Pleurotus ostreatus</i>	96
Anexo 2: Preparación y pesaje de los sustratos.....	96
Anexo 3: Esterilización de los sustratos.....	97
Anexo 4: Inoculación de medio sólido para preparar inóculo líquido	97
Anexo 5: Agitación de los sustratos con <i>Pleurotus ostreatus</i>	98
Anexo 6: Pellets observados en los sustratos líquidos	98
Anexo 7: Filtración de los pellets para medición de biomasa.....	99
Anexo 8: Prueba de antagonismo <i>Pleurotus ostreatus</i> con otros microorganismos	99
Anexo 9: Disposición de las cubetas en el área destinada para el tratamiento	100
Anexo 10: Suelo autoclavado listo para ser dispuesto en las unidades experimentales.....	100
Anexo 11: Pesaje de los suelos en las cubetas (Unidades experimentales)	101
Anexo 12: Disposición de los suelos en las cubetas en el lugar experimental.....	101
Anexo 13: Tratamiento 1 con sus réplicas y blanco.....	102
Anexo 14: Tratamiento 1; réplicas y blanco luego de transcurrido un tiempo del tratamiento	102
Anexo 15: Tratamiento 2 con sus réplicas y blanco.....	103
Anexo 16: Tratamiento 2; réplicas y blanco luego de transcurrido un tiempo del tratamiento	103
Anexo 17: <i>Pleurotus ostreatus</i> visto al microscopio (Micelio)	104
Anexo 18: Muestras tomadas del Tratamiento 1 y su codificación	104
Anexo 19: Muestras tomadas del Tratamiento 2 y su codificación	105
Anexo 20: Resultados de Análisis de Laboratorio	106
Anexo 21: Registro de Temperaturas durante el tratamiento del suelo.	116
Anexo 22: Registro de humedades durante el tratamiento del suelo.	117

Anexo 23: Análisis estadístico Biomasa, (Sustrato Tiempo) ANOVA dos factores	118
Anexo 24: Interacción Sustrato – Tiempo sobre la biomasa.....	119
Anexo 25: Comparaciones Múltiples LSD	119
Anexo 26: Comparaciones Múltiples HSD.....	120

RESUMEN

El estudio de la viabilidad de crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus* aplicado en inóculo líquido para uso en biorremediación, se llevó a cabo en LABCESTTA de la ciudad de Riobamba probando diferentes sustratos líquidos donde pueda crecer el Hongo, con el fin de elegir el que reúna las mejores características de desarrollo del micelio para posteriormente utilizar este inóculo en procesos de biorremediación.

La investigación fue netamente experimental; probando 9 sustratos o medios de cultivo denominados Avena, Cebada, Arroz, Extracto de Levadura, Trigo, Panela los cuales provienen del rechazo de diferentes cereales (afrecho), los que fueron elegidos por su bajo costo y fácil adquisición, ensayando composiciones y concentraciones.

La Temperatura e iluminación natural no tuvieron mayor repercusión en el desarrollo del micelio, con respecto al tiempo de permanencia en el sustrato y la cantidad de biomasa obtenida los valores fueron muy variados llegando a tener micelio en sustrato líquido confirmando el crecimiento con la formación de Pellets en tan solo seis días (25,97 g/l) a comparación de otros sustratos donde al pasar 27 días no se obtuvo la consistencia esperada para aplicar en procesos de biorremediación.

Para los ensayos de biorremediación se realizaron dos variantes de tratamiento, Tratamiento 1 (T1) y Tratamiento 2 (T2) con sus respectivos blancos utilizados como testigos (atenuación natural), los tratamientos se diferenciaban en que en el primero se sometió a un proceso de esterilización para evidenciar la acción biorremediadora del Hongo *Pleurotus ostreatus* independientemente de los resultados.

Se realizó un control de los tratamientos mediante análisis físico químicos pH, Temperatura, Hidrocarburos Totales de Petróleo “TPH”, Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos “HAP”, Cadmio, Níquel, Plomo

Se obtuvo una reducción de Hidrocarburos de Petróleo en los tratamientos T1 U1 con 90 % de eficiencia, T1 U2 88 %, T1 U3 92 %, T2 U1 91 %, T2 U2 87 % T2 U3 97 %.

parámetro en el cual nos centramos en la investigación ya que los valores de metales pesados e Hidrocarburos Aromáticos estaban dentro del rango permisible.

En esta investigación se obtuvo un cultivo acuoso de hongo *Pleurotus ostreatus*, y se realizó el estudio de su aplicación en procesos de Biorremediación obteniendo porcentajes altos de eficiencia para recuperar suelos y sedimentos.

Se recomienda seguir investigando al hongo *Pleurotus ostreatus*, ya que es una tecnología alternativa, y de fácil puesta en práctica para procesos de biorremediación.

SUMMARY

The feasibility study of the growth of the fungus *Pleurotus ostreatus* applied in the inoculate for use in bioremediation was carried out in the LABCESTTA of Riobamba city, testing different liquid substrates where the fungus can grow to choose the one with the best development investigation characteristics of the mycelium to later use this inoculate in bioremediation processes. The investigation was experimental testing 9 substrates or culture media called oats barley, Rice, Leaven extract, Wheat, Sugar cane Tablet witch came from the wastes of the different cereals (bran) which were chosen for their low cost and easy acquisition assaying compositions and concentrations, The temperature and natural illumination did not have any major repercussion in the mycelium development as to the time of permanence in the substrate and biomass quantity obtained; the values were varied having the mycelium in the liquid substrate, confirming the growth with the formation of pellets in only six days (25.97 g/l) as compared to other substrates where al 27 days dis not have the expected consistency to apply in bioremediation processes. For the bioremediation trials two treatment variants were carried out: Treatment 1 (T1) and Treatment 2 (T2) with their corresponding targets used as controls (natural attenuation); the treatments were different in that in the first one there was a sterilization process to make it evident the bioremediation action of the fungus *Pleurotus ostreatus* independently of the results. A treatment control was carried out through the physical and chemical analysis, pH Temperature Total Hydrocarbons of oil "TPH", Polycyclic Aromatic "HAP" Cadmium Nickel, and Plumb. A reduction of oil Hydrocarbons was obtained in treatments T1 U1 with 90 % de efficiency, T1 U2 88 %, T1 U3 92 %, T2 U1 91 %, T2 U2 87 % T2 U3 97 %, a parameter in which the investigation was centered as the values of heavy metals and Aromatics Hydrocarbons were within the permissible range It is concluded that this investigation obtained aqueous fungus to be applied in bioremediation processes and attain good results to recover soils and sediments It is recommended to carry out further investigation as it is an economic and easy alternative put into practice and of great scientific contribution.

INTRODUCCIÓN

En el campo de la biorremediación se ha venido desarrollando investigaciones para brindar soluciones a problemas ambientales y aportar con la ciencia. Se han implementado tratamientos biológicos de biorrecuperación con *Pleurotus ostreatus*, para la biorremediación de efluentes coloreados, suelos contaminados con aceites usados de automóvil, suelos contaminados con metales pesados, sedimentos de ríos contaminados con compuestos provenientes de hidrocarburos; poniendo en evidencia la capacidad degradadora de este hongo como elemento fundamental en el tratamiento de los recursos suelo y agua sin afectar negativamente las condiciones ambientales naturales.(6-2-9)

La biorremediación de suelos contaminados con petróleo es desarrollada para limpiar y/o disminuir el contenido de hidrocarburos de diferentes niveles de toxicidad presente en los suelos después de ocurrir un derrame; son numerosas las metodología biológicas que se utilizan con este propósito, pero todos están basadas en la capacidad de los microorganismo de biotransformar compuestos orgánicos, por lo general hacia productos menos tóxicos o de más fácil degradación.

La técnica de biorremediación propuesta es la utilización del Hongo *Pleurotus ostreatus* aplicado en inóculo líquido requiere que la inoculación en el suelo se realice con un mayor alcance en la superficie del mismo. Las características del hongo como un buen degradador permiten que el micelio del hongo pueda expandirse y penetrar en el suelo y de esta manera comience la biorremediación.

Haciendo un buen manejo de este hongo se podrán tener buenos resultados en la disminución de algunos elementos contaminantes provenientes de los hidrocarburos.

Dado el hecho de que este género ha demostrado tener tantas capacidades en diferentes áreas, sobretodo en el área de biorremediación y por estar comprobada la eficacia en la biodegradación de algunos componentes, es que el hongo *Pleurotus ostreatus* fue escogido para la realización de este estudio.

Esta investigación se basa en el estudio de la viabilidad del crecimiento del Hongo *Pleurotus ostreatus* en diferentes sustratos líquidos con nutrientes y carbono para que se puede desarrollar favorablemente; la observación y valoración de su crecimiento, y luego el estudio del sustrato con mejor crecimiento en suelos contaminados con Hidrocarburos permite ir evaluando el comportamiento biorremediador del inóculo líquido escogido.

El Centro de Servicios Técnicos y Transferencia Tecnológica Ambiental (CESTTA) en su afán de buscar tecnologías nuevas e innovadoras ha emprendido proyectos de investigación enmarcados en el área de la Biotecnología Ambiental utilizando organismos como Hongos los cuales son una alternativa amigable con los procesos naturales para los tratamientos de contaminantes.

En la presente investigación se han planteado los siguientes objetivos:

OBJETIVO GENERAL:

Estudiar la viabilidad de crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus* aplicado en inóculo líquido para uso en biorremediación.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Formular los sustratos líquidos donde se pueda desarrollar el hongo con los nutrientes necesarios.
- Seleccionar el mejor sustrato de acuerdo a las características de crecimiento que se obtenga.
- Caracterizar el suelo contaminado física, químicamente antes y con su respectivo seguimiento después del tratamiento para obtención de datos de control.
- Biorremediar el suelo contaminado con los inóculos líquidos de *Pleurotus ostreatus*.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 BIORREMEDIACIÓN

La biorremediación es una tecnología que utiliza el potencial metabólico de los microorganismos (fundamentalmente bacterias, pero también hongos y levaduras) para transformar contaminantes orgánicos en compuestos más simples poco o nada contaminantes y por tanto, se puede utilizar para limpiar suelos o aguas contaminadas.

(3)

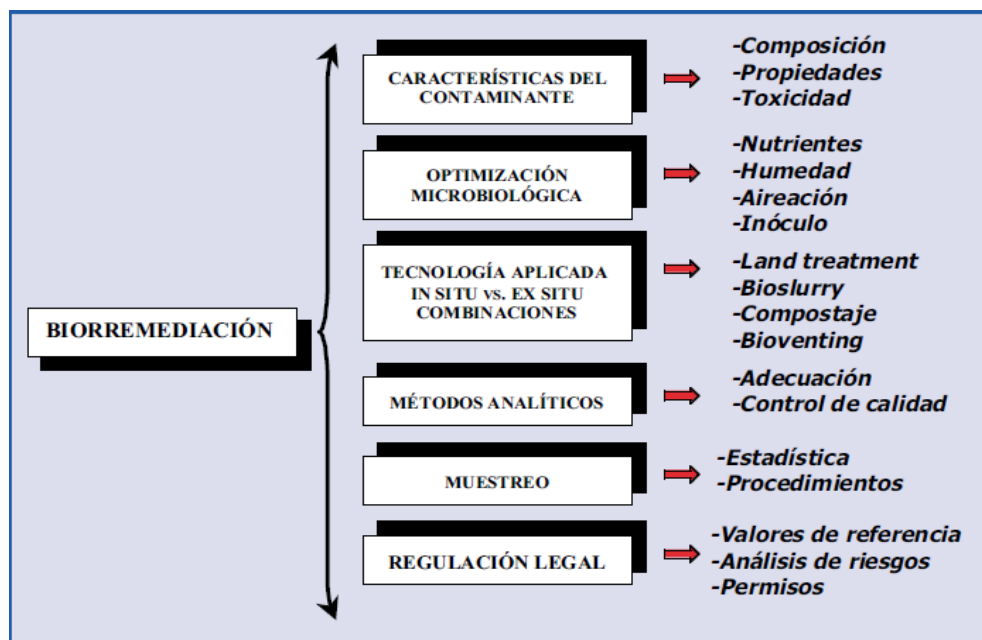


Figura 1: Biorremediación

Fuente: http://ingenierosdeminas.org/docu/documentos/fundamentos_%20biorremediacion.pdf

Algunos de los parámetros más importantes a tomar en consideración incluyen la biodegradabilidad, la distribución del contaminante en las distintas fases, el potencial de lixiviación, la reactividad química de los contaminantes, el tipo y propiedades del suelo, la disponibilidad de oxígeno y la presencia o ausencia de sustancias inhibidoras. La utilización de la capacidad de degradación de los microorganismos es la base fundamental de los tratamientos biológicos de contaminaciones orgánicas. En consecuencia, el conocimiento de las características fisiológicas y bioquímicas así como de la ecología y genética de las especies o consorcios microbianos involucrados, es un requisito esencial, junto con el conocimiento de la naturaleza del emplazamiento y la elección de un protocolo adecuado, para lograr el objetivo de dichos tratamientos.

Los tratamientos de biodescontaminación se basan en la acción de microorganismos o plantas sobre los productos contaminantes. Los contaminantes tratados habitualmente por estos métodos son los compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles no halogenados y los derivados del petróleo. Cuando la contaminación incluye altas concentraciones de metales, compuestos orgánicos con alta proporción de cloro o sales inorgánicas, la eficacia del tratamiento se reduce debido a la toxicidad microbiológica de estos compuestos.

La biotecnología ofrece buenas perspectivas para descontaminar los efluentes industriales. Los microorganismos pueden ser modificados para producir principalmente determinadas enzimas que contribuyan a metabolizar los compuestos producidos como consecuencia de la actividad industrial y que son tóxicos para otras formas de vida.

Incluso, se pueden diseñar rutas metabólicas alternativas para la biodegradación de residuos complejos. (1)

El proceso biológico para tratar los compuestos tóxicos, debe competir con los métodos existentes en términos de economía y eficiencia. Los procesos biológicos tienen las ventajas de requerir inversiones de capital moderadas, bajo consumo de energía, ser ambientalmente seguros y no generar residuos.

El tratamiento biológico mediante plantas (fitodescontaminación) implica el uso de vegetales superiores para retirar, contener, acumular o degradar los contaminantes ambientales del suelo, aguas subterráneas, aguas superficiales, sedimentos y aire. Esta definición se aplica a todos los procesos biológicos, químicos y físicos sobre los que pueden influir las plantas (incluyendo la rizosfera con hongos) y que ayudan en la limpieza de espacios contaminados.

Las plantas pueden ser usadas en la descontaminación aprovechando su capacidad de mineralizar determinados compuestos tóxicos o de acumular y concentrar metales pesados y otros compuestos inorgánicos del suelo

Algunos microorganismos pueden metabolizar productos como combustibles o disolventes, que constituyen un riesgo para la salud humana y para los ecosistemas en los que son vertidos. Una vez que los contaminantes son degradados, la población microbiana decrece, al consumirse lo que constituía su fuente nutritiva.

El objetivo de las técnicas de recuperación biológica, es la creación de las condiciones ambientales óptimas para que los microorganismos se puedan desarrollar adecuadamente y provocar la máxima destoxificación. (1)

Cuando en el ecosistema no esté presente la actividad biológica que se requiere para degradar la contaminación producida, pueden incorporarse microorganismos de otra procedencia cuya eficacia haya sido probada anteriormente.

En este caso, se habla de microorganismos exógenos. Cuando esto sucede, hay que asegurarse de que las condiciones de este nuevo emplazamiento permitirán el desarrollo de la microflora incorporada.

Entre las posibles técnicas de tratamiento aplicables para la descontaminación de un determinado espacio natural, merecen especial atención los procesos de degradación biológica ya que son útiles para muchos tipos de residuos orgánicos, son procesos naturales que no suponen un impacto adicional sobre los ecosistemas y que se pueden realizar a un bajo coste. En muchos casos, pueden llevarse a cabo en el sitio donde se ha producido la contaminación, con lo cual se elimina la necesidad de transportar materiales peligrosos.

El uso de microorganismos no está restringido únicamente al tratamiento de compuestos orgánicos. En algunos casos, los organismos seleccionados pueden también reducir los cationes tóxicos de los metales pesados (como el selenio), a la forma elemental menos soluble y menos tóxica. Por lo tanto, el tratamiento biológico puede también aplicarse a las aguas superficiales contaminadas por metales pesados. (1)

1.2 ATENUACIÓN NATURAL

La atenuación natural se puede describir como el conjunto de procesos físicos, químicos y biológicos, que espontáneamente ocurren en un espacio determinado, con posterioridad a la aparición de la contaminación en el mismo. En condiciones favorables, la atenuación natural reduce, sin la intervención humana, la masa, la toxicidad, la movilidad, el volumen o la concentración de contaminantes en suelo o agua subterránea. Este proceso incluye diversos mecanismos tales como dispersión, dilución adsorción, volatilización, estabilización y transformación o destrucción de contaminantes por vía química o biológica. (4)

1.3 APLICACIONES DE HONGOS EN TRATAMIENTOS DE BIODERIVACIÓN

Aunque buena parte de los estudios de descontaminación biológica se han centrado en bacterias por la facilidad que ofrecen para estudiar sus vías metabólicas y llevar a cabo construcciones genéticas que permitan degradar específicamente determinados compuestos contaminantes, la capacidad de los hongos para transformar una gran variedad de compuestos orgánicos y llevarlos hasta CO₂ y H₂O ofrece un potencial indiscutible para su utilización en procesos de tratamiento de contaminaciones. Ese potencial radica fundamentalmente en las características de su sistema enzimático y en su vigoroso crecimiento que les permite, a través del desarrollo de su micelio, colonizar diferentes tipos de sustratos y acceder a los compuestos que constituyen las contaminaciones más frecuentes de los suelos. El elevado valor de la relación superficie/volumen celular de los hongos filamentosos les convierte en eficaces

degradadores en determinados nichos como los suelos contaminados. Por otra parte, los hongos tienen una capacidad muy notable para acumular metales pesados como cadmio, cobre, mercurio, plomo y zinc, lo que está demostrado por los aislamientos realizados en minas de cobre, zinc o plomo. También se ha detectado una gran diversidad de especies que viven en ríos con una alta concentración de minerales y bajo pH. (1)

1.4 CARACTERÍSTICAS DE *PLEUROTUS* Y HONGOS BASIDIOMICETOS EN BIORREMEDIACIÓN

Pleurotus ostreatus es útil en el biorremediación porque puede colonizar la tierra fácilmente contaminada y puede degradar HAP's, se ha encontrado que tiene potencial para mineralizar HAP's de 5 anillos en mayor cantidad completamente. (6-8)

Los hongos basidiomicetos ligninolíticos producen un conjunto de enzimas extracelulares para metabolizar la lignina que les confieren, asimismo, la capacidad de degradar un amplio abanico de contaminantes. La aplicación de estos hongos para tratar y recuperar espacios contaminados tiene un interés creciente. (1)

1.4.1 UBICACIÓN TAXONÓMICA DEL HONGO *Pleurotus ostreatus*.

El género *Pleurotus* pertenece a la clase de basidiomicetos, comprende a los hongos superiores, cuya principal característica es la presencia de basidios o protuberancias, sobre los cuales se producen las basidiosporas. (5)

1.4.2 FORMA DE NUTRICIÓN

Los macromicetos del género *Pleurotus* son hongos saprofitos, la capacidad de penetración de sus hifas además les permite degradar incluso materias estructuralmente complejas, como madera, cutículas de insectos, Estos hongos producen enzimas que intervienen en la degradación de celulosa y lignina, obteniendo así su fuente de carbono y los nutrientes minerales necesarios para su crecimiento.

En estudios realizados con macromicetos se ha podido observar que los requerimientos de estos organismos pueden variar según los nutrientes presentes en el medio, por lo tanto la utilización de sustratos adecuados es conveniente para el crecimiento óptimo de los hongos, si el medio de cultivo contiene todos los requerimientos nutritivos en cantidad suficiente para que el organismo sintetice sus metabolitos y tome la energía que requiere, el hongo crecerá adecuadamente. (5)

El carbono es necesario para los hongos porque es la fuente directa de energía para su metabolismo; así mismo, es necesario para la formación de las diferentes partes y estructuras celulares. Dada la importancia que tiene para la vida de las células, éste elemento es el que se requiere en mayores cantidades, el carbono puede ser utilizado por el hongo a partir de diferentes fuentes como polímeros (celulosa y lignina), carbohidratos, lípidos, etc.

Los carbohidratos se encuentran entre las fuentes de carbono preferidas por las especies de *Pleurotus*, la glucosa, la manosa y la galactosa son buenos sustratos para este hongo. Por otra parte el género *Pleurotus* tienen la capacidad de crecer sobre fuentes inorgánicas de nitrógeno, como el nitrato de potasio o la urea, aunque se observa que

prefieren las fuentes orgánicas para un crecimiento óptimo. La peptona es una fuente de nitrógeno que da un rápido crecimiento micelial y formación de cuerpos fructíferos, mientras que los aminoácidos alanina, ácido aspártico, glicina y serina, dan rendimientos pobres. (5)

1.4.3 CRECIMIENTO MICELIAL

El crecimiento del micelio del hongo varía según si se realiza en un medio líquido o en un medio sólido. En el primero crece sólo sobre la superficie cuando el líquido está en reposo; pero si el medio es permanentemente agitado, pueden crecer en todo el volumen. Según las condiciones, el hongo puede o no formar pequeñas esferas de micelio denominadas “pellets”. En medio líquido, los hongos suelen presentar un desarrollo típico, similar al de otros organismos y que consta de las siguientes fases: de adaptación o Lag, exponencial o Log, estacionaria, declinación y muerte. (1)

1.4.4 IMPORTANCIA DEL CULTIVO LÍQUIDO DEL MICELIO

Una alternativa para la obtención de “semilla” es la utilización de micelio crecido en medio líquido ya que permitirá producir mayor cantidad de biomasa de mejor calidad en menor tiempo, favorecerá la adaptación y dispersión del hongo y facilitará su manipulación durante la siembra. (5)

1.4.5 CONTAMINANTES

Hidrocarburos Totales de Petróleo

Los TPH son una mezcla de productos químicos compuestos principalmente de hidrógeno y carbono, llamados hidrocarburos los científicos han dividido a los TPH en grupos de hidrocarburos de petróleo que se comportan en forma similar en el suelo o en el agua estos grupos se llaman fracciones de hidrocarburos de petróleo, cada fracción contiene muchos productos químicos individuales.

Algunas sustancias químicas que pueden encontrarse en los TPH incluyen a hexano, combustibles de aviones de reacción, aceites minerales, benceno, tolueno, xilenos, naftalina y fluoreno, como también otros productos de petróleo y componentes de gasolina sin embargo es probable que muestras de TPH contengan solamente algunas o una mezcla de estas sustancias químicas. (7)

Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos

Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP's) son compuestos orgánicos formados por tres o más anillo condensados en donde algunos átomos de carbono son comunes a dos o tres anillos. Los anillos pueden estar en línea recta, angulada o ramificada. A demás al tener el término hidrocarburo se entiende que la molécula tiene carbono e hidrógeno. (9)

Metales Pesados

Tradicionalmente se llama metal pesado a aquel elemento metálico que presenta una densidad superior a 5g/mL, aunque para efectos prácticos en estudios medioambientales

se amplía esta definición a todos aquellos elementos metálicos o metaloides, de mayor o menor densidad, que aparecen comúnmente asociados a problemas de contaminación. Algunos de ellos son esenciales para los organismos en pequeñas cantidades, como el Fe, Mn, Zn, B, Co, As, V, Cu, Ni o Mo, y se vuelven nocivos cuando se presentan en concentraciones elevadas, mientras que otros no desempeñan ninguna función biológica y resultan altamente tóxicos, como el Cd, Hg y el Pb. Estos elementos tienen su origen en el substrato litológico, apareciendo bien como elementos nativos o incorporados normalmente en las estructuras de sulfuros, silicatos, carbonatos, óxidos e hidróxidos.

(9)

Metales Pesados en Suelo

Son fuentes importantes de metales en suelos las cenizas y escorias de los procesos de combustión de carbón fósil o derivados del petróleo, el aporte directo procedente de actividades agrícolas (adición de fertilizantes, pesticidas, lodos de depuradoras, composteo, etc.) y su acumulación a partir de residuos industriales, urbanos y mineros (metalurgia, fabricación de pinturas, barnices, disolventes, baterías, textiles, curtidos, etc.

Al hablar de contaminación por metales hay que tener en cuenta que más importante que el contenido total de un elemento en el suelo es la forma o especie química bajo la que se encuentra, es decir, su especiación. Así, la forma resultante de dicha especiación va a influir decisivamente en su distribución en el suelo, condicionando su solubilidad, su movilidad en el suelo y las aguas superficiales y subterráneas, su biodisponibilidad y toxicidad, por tanto, su comportamiento como contaminante potencial.

La dinámica y disponibilidad de los metales están muy influenciadas por las condiciones fisicoquímicas del suelo en el que se encuentran, como el pH y el potencial rédox, mientras que los constituyentes orgánicos e inorgánicos del suelo son los que en gran medida condicionan los mecanismos de retención de metales por adsorción, formación de complejos y precipitación fundamentalmente.

Además, las plantas y los microorganismos (bacterias hongos y algas) del suelo también pueden interaccionar con los metales mediante mecanismos de extracción, estabilización, bioadsorción, bioacumulación, biomineralización y biotransformación. En cualquier caso, es importante resaltar que los metales tóxicos en los suelos no pueden ser destruidos sino sólo neutralizados y que pequeñas variaciones en las condiciones del medio edáfico pueden liberar los metales anteriormente insolubilizados, por lo que es necesario realizar un seguimiento en profundidad de la distribución de estos contaminantes en el suelo, especialmente de los más tóxicos. (9)

CAPITULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 LUGAR DE LA INVESTIGACIÓN

La presente investigación se desarrolló en el laboratorio de Biotecnología del Centro de Servicios Técnicos y Transferencia Tecnológica Ambiental CESTTA de la Facultad de Ciencias ubicado a 2756 m.s.n.m. con una temperatura promedio de 13 °C - 17 °C, humedad relativa promedio de 30 – 40% y una presión atmosférica de 540 mm Hg.

Los análisis físico-químicos del suelo se realizaron en el laboratorio de Análisis Ambiental e Inspección LABCESTTA con acreditación en la ISO/IEC 17025:2005.

2.2 MATERIALES UTILIZADOS

Suelo Contaminado

El suelo contaminado procedió de los remanentes de los análisis realizados en el LABCESTTA el cual fue muestreado y homogenizado para su tratamiento el cual presenta características heterogéneas ya que su lugar de procedencia primario no se conoce, para fines de este trabajo, pero si es apto para el tratamiento a ser

experimentado, ya que no debe ser dispuesto al ambiente sin ningún tratamiento por que causaría impactos negativos al ecosistema.

Material biológico

Se utilizó la cepa de hongo *Pleurotus ostreatus* var. *Florida* la cual se encuentran en el laboratorio del Centro de Servicios Técnicos y Transferencia Tecnológica Ambiental, las cepas fueron cultivadas en medio sólido de “Potato Dextrose Agar” y otras con Agar “Sabouraud Dextrose”, e incubadas a 28 °C para su crecimiento micelial.

Sustratos

Sustancia en la cual crece el micelio, las propiedades físicas y químicas del mismo determinan la eficiencia de crecimiento del hongo.

Los sustratos utilizados fueron:

- Afrecho de Avena
- Afrecho de Trigo
- Afrecho de Cebada
- Afrecho de Arroz
- Extracto de levadura, el cual es utilizado para enriquecer medios de cultivo
- Panela o melaza, proveniente de los residuos de caña o la alimentación de ganado.

Los afrechos provienen del rechazo de la molienda de los cereales.

La abreviatura de los sustratos es la siguiente tabla:

Tabla I: Descripción abreviaturas

Donde	
A	Avena
AP	Avena + Panela
C	Cebada
E	Extracto de levadura
T	Afrecho de Trigo
TP	Afrecho de Trigo + Panela
TPE	Afrecho de Trigo + Panela + Extracto de Levadura
Ar	Afrecho de Arroz
ArE	Afrecho de Arroz + Extracto de Levadura

S/M	Sin Medición
B/M	Biomasa

t1	Semana 1
t2	Semana 2
t3	Semana 3
t4	Semana 4

2.3 MUESTREO

2.3.1 Método de Muestreo

Probabilístico, Aleatorio Simple

- Se definirá la población, número total de, cajas Petri con micelio de hongo cultivado y suelos contaminados (muestras que quedan como residuo de los análisis efectuados de un determinado mes).

- Registrar todos los miembros de la población
- Asignar un código o número a cada miembro de la población
- Mediante el software Excel procederemos a determinar los sujetos de la muestra.

2.3.2 Tamaño de la Muestra

- Se debe conocer el tamaño de la población (N)
- Se debe establecer el error estándar (se), es decir el error que aceptamos cometer al realizar el estudio. Dicho valor se da como una fracción de 1 y se interpreta como se hace con la probabilidad, se fija por el investigador.
- Se determina la varianza de la población (se^2)
- Se determina la varianza de la muestra la cual es igual a $p(1-p)$. Para el caso es el nivel de ocurrencia fijado por el investigador.
- Se calcula el tamaño de la muestra sin ajustar (n') mediante:

$$n' = \frac{s^2}{V^2}$$

Donde

$$S^2 = p(1-p)$$

$$V^2 = se^2$$

- Se calcula el tamaño de la muestra (n) mediante.

$$n = \frac{n'}{1 + \frac{n'}{N}}$$

2.4 METODOLOGIA

La metodología aplicada para el ESTUDIO DE LA VIABILIDAD DE CRECIMIENTO DEL HONGO *Pleurotus ostreatus* APLICADO EN INÓCULO LÍQUIDO PARA USO EN BIORREMEDIACIÓN correspondió a lo siguiente.

Se obtuvo el hongo *Pleurotus ostreatus* var. Florida, y luego se realizaron los ensayos necesarios. Se sembró el micelio *Pleurotus ostreatus*, en cajas Petri que contiene agar específico para hongos; cuando el micelio invadió totalmente la caja Petri se procedió a realizar el muestreo aleatorio respectivo para obtener la muestra representativa de toda la población y con las cuales se procedió a realizar las pruebas y ensayos de crecimiento en sustratos líquidos probando diferentes composición de sustratos, tiempos de permanencia del cultivo para elegir el mejor según las características que se observen.

Después de obtener el mejor inóculo líquido se procedió a muestrear los suelos contaminados almacenados en el LABCESTTA y que quedan como residuo sólido luego de los análisis; después de homogenizarlos, se procedió a disponer esos suelos en recipientes rectangulares plásticos por triplicado; tres recipientes con suelo autoclavado, tres con suelo sin autoclavar y dos blancos.

Se realizó la caracterización físico-químico en los suelos contaminados, se inocularon esos suelos con el micelio en inóculo líquido y se verificaron los cambios cualitativos producidos; a los noventa días se analizaron nuevamente las unidades experimentales para verificar los cambios producidos durante el proceso de biorremediación y darles la disposición final respectiva.

2.5 DISEÑO EXPERIMENTAL

Para el desarrollo de la siguiente investigación se probaron nueve sustratos cada uno con diferente composición, con tres procesos de preparación; 4 sustratos para el primero, 3 para el segundo, y 2 para el tercero.

La investigación consistió en el estudio y evaluación de una tecnología biológica utilizando *Pleurotus ostreatus* para su uso en biorremediación de suelos contaminados. Se trabajó con 2 tratamientos, con tres unidades experimentales cada uno y su blanco correspondiente, a las que se les cubrió con plástico y cada día se les subministra agua para mantener la humedad y se les aireó mediante volteo.

TIPO DE DISEÑO

Para este experimento se vio la necesidad de trabajar con dos tipos de diseño los cuales serán descritos a continuación.

Diseño Factorial: en este tipo de diseño el investigador manipula las variables donde se incluyen niveles de presencia en cada una de ellas la denominación de este tipo se hace por el número de variables independientes y el número de niveles de cada una de ellas.

Tabla II: Diseño de la Investigación

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9
t1	S1t1	S2t1	S3t1	S4t1	S5t1	S6t1	S7t1	S8t1	S9t1
t2	S1t2	S2t2	S3t2	S4t2	S5t2	S6t2	S7t2	S8t2	S9t2
t3	S1t3	S2t4	S3t3	S4t3	S5t3	S6t3	S7t3	S8t3	S9t3
t4	S1t4	S2t4	S3t4	S4t4	S5t4	S6t4	S7t4	S8t4	S9t4

Sustrato= se hará el experimento con 9 tipos de sustratos.

Tabla III: Numero de sustratos

DONDE	
S1	Sustrato 1
S2	Sustrato 2
S3	Sustrato 3
S4	Sustrato 4
S5	Sustrato 5
S6	Sustrato 6
S7	Sustrato 7
S8	Sustrato 8
S9	Sustrato 9

Semanas = tiempo en semanas en las que se revisará los sustratos, donde no se medirá biomasa sino solo se observará el aparecimiento de pellets bien definidos, la biomasa será medida cuando se observe que el sustrato ha sido consumido (la solución del sustrato se torne más clara o transparente), donde el máximo tiempo de espera será cuatro semanas.

Tabla IV: Descripción de Tiempos

t1	Tiempo de observación de aparición de pellets semana 1
t2	Tiempo de observación de aparición de pellets semana 2
t3	Tiempo de observación de aparición de pellets semana 3
t4	Tiempo máximo de observación de aparición de pellets semana 4

Diseño experimental temporal: (de cronologías múltiples, observaciones luego del tratamiento), se lo utiliza cuando se quiere medir los efectos de un determinado tratamiento a largo plazo.

R G₁ O₁ X O₂ O₃

R G₃ O₁ - O₂ O₃

R G₂ O₁X O₂ O₃

R G₄ O₁ - O₂ O₃

R= Suelo contaminado del LABCESTTA (muestreo aleatorio simple).

G₁= Suelo contaminado estéril.

G₂= Suelo contaminado sin esterilizar.

G₃= Suelo contaminado estéril (blanco).

G₄= Suelo contaminado sin esterilizar (blanco).

O₁= Análisis físico químico de suelo antes del tratamiento con el hongo.

X = Tratamiento; aplicación del hongo *Pleurotus ostreatus* en inóculo líquido

- = Sin hongo *Pleurotus ostreatus*

O₂-O₃= Análisis físico químico, luego de haber puesto el inóculo líquido de Hongo *Pleurotus ostreatus*

Tratamientos

El suelo contaminado de diferente composición tiene un peso de 20 Kg.

Se lo repartió equitativamente en las 8 cubetas plásticas, los tratamientos son

T1= inóculo líquido de *Pleurotus ostreatus* en suelo estéril.

T2= inóculo líquido de *Pleurotus ostreatus* en suelo sin esterilizar.

Las unidades experimentales se mantuvieron a temperatura ambiente, para ayudar al proceso de biorremediación se dio aireación manual mediante volteo.

La finalidad de Autoclavar el suelo en el tratamiento 1 no fue esterilizarlo completamente sino disminuir su carga bacteriana para asegurarnos que el Hongo sea el que actúe en mayor proporción en las respectivas unidades experimentales.

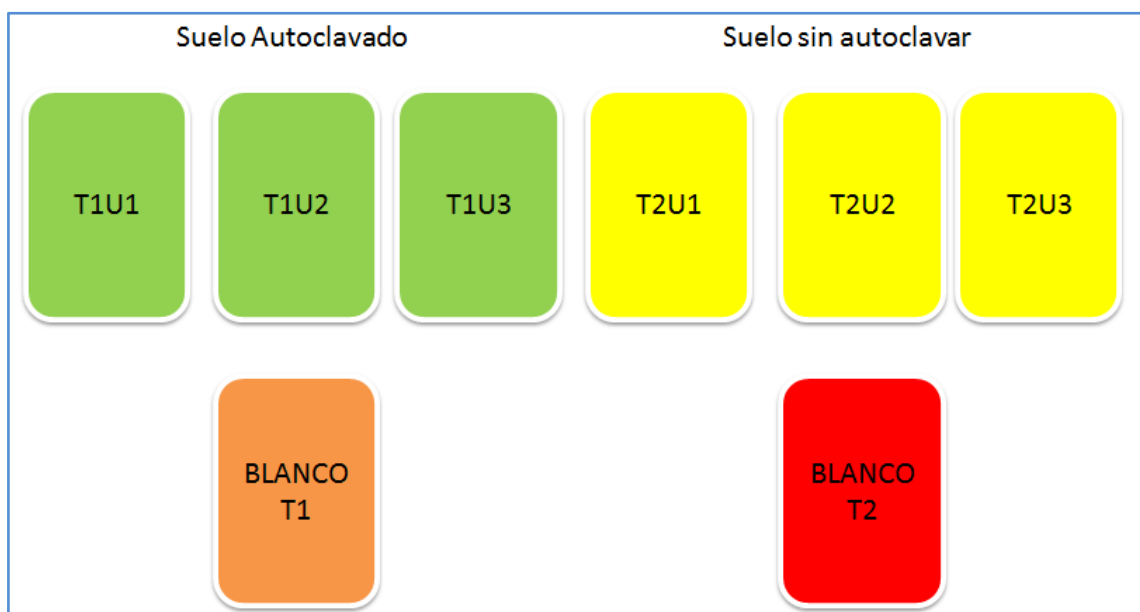


Figura 2: Disposición de Tratamientos y unidades experimentales

Parámetros de control

Es imprescindible que se tome en cuenta parámetros de control durante el proceso de biorremediación (tres meses).

- pH
- Humedad
- Temperatura

Parámetros de medición

- Los parámetros a medir en cada una de las unidades experimentales son los descritos en la tabla 6 de la RAHOE: TPH, HAP's, metales pesados Cd, Ni, Pb, y son comparados con los límites permisibles para uso en suelo agrícola. Los parámetros son medidos cada 4 semanas.

2.6 MÉTODOS

Tabla V. Métodos de Análisis

PARÁMETRO	MÉTODO	REFERENCIA
pH	Potenciométrico	EPA 9045 D. 2004
CE	Potenciométrico	EPA 9045 D. 2004
Humedad	Gravimetría	NA
Temperatura	Termómetro calibrado	APHA 2550 B, Ed.21
Masa fúngica	Método gravimétrico	NA
Volumen	Métrico	NA

(Continuación de la Tabla V. Métodos de Análisis)

Hidrocarburos totales de petróleo(TPH),	Cromatografía de gases	TNRCC 1005, Junio 2001
Hidrocarburos aromáticos Policíclicos (HAP's),	Cromatografía HPLC	EPA SW- 846 N 8310. 1986 EPA SW- 846 N 3540, 1992
Metales Cadmio (Cd) Níquel (Ni) Plomo (Pb)	Espectrofotometría de Absorción Atómica Llama, Aire-Acetileno	EPA SW- 846 N 3050B,7130.1986 EPA SW- 846 N 3050B, 7520.1986 EPA SW- 846 N 3050B, 7420.1986

CAPITULO III

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 REACTIVACIÓN DEL MICELIO *Pleurotus ostreatus*

Los hongos necesitan nutrientes ricos en carbono, por esta razón se escogió el agar PDA “Potato Dextrose Agar” y “Sabouraud Dextrose” debido a su alto contenido de dextrosa para la reactivación del micelio *Pleurotus ostreatus*.

3.1.1 MATERIALES EQUIPOS Y REACTIVOS

- Frascos de vidrio
- Cajas Petri
- Lámpara de alcohol
- Agua Bi destilada
- PDA
- Agar Sabouroud
- Balanza analítica digital
- Cámara de flujo laminar
- Autoclave
- Estufa

3.1.2 PROCEDIMIENTO

- a. Preparar 200 mL de agar PDA y esterilizar en autoclave: 20 minutos a 121⁰C.
- b. Dejar enfriar a temperatura ambiente.
- c. Distribuir el agar en las cajas Petri trabajando en condiciones asépticas.
- d. Con un asa inocular el agar colocando el micelio hacia abajo.
- e. Sellar las cajas e incubar a 28⁰C.

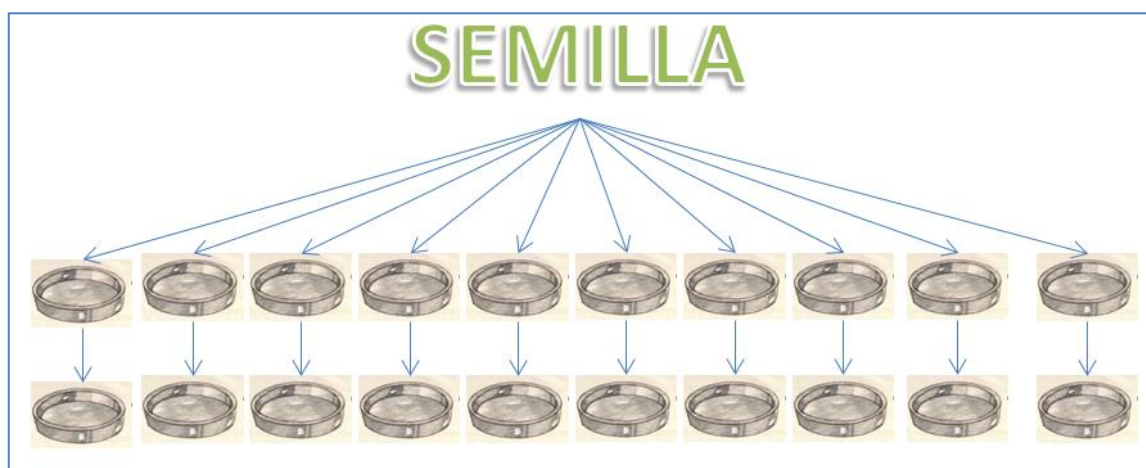


Figura 3: Semilla y Repique de Hongo *Pleurotus ostreatus*

3.2 PREPARACIÓN DE SUSTRATOS LÍQUIDOS

El “sustrato” es el material sobre el cual crece el micelio. Las propiedades físico-químicas del sustrato son las que determinan que hongos o que microorganismos pueden crecer en él.

Se prepararon diferentes tipos de sustratos, con diferentes formas de preparación.

3.2.1 MATERIALES EQUIPOS Y REACTIVOS

- Erlenmeyer de 250 mL
- Papel aluminio
- Embudo
- Lámpara de alcohol, algodón y gaza
- Espátula
- Sacabocados
- Agua bi destilada
- Extracto de levadura
- PDA
- Agar Sabouroud
- Plancha Agitadora
- Balanza analítica digital
- Cámara de flujo laminar
- Autoclave

3.2.2 Procedimiento 1 (sustrato sin filtrar y autoclavado)

- a. Colocar los componentes de los sustratos A, AP, C, y E; en un frasco bien limpio con agua bi-distilada, y agitar bien por tres minutos.
- b. Repartir en los Erlenmeyer 50 ml y luego esterilizar en la autoclave a 121 °C y 1,1 atm de presión durante 15 minutos.
- c. Esterilizar y dejar enfriar hasta temperatura ambiente y proceder a sembrar el inóculo obtenido de las cajas Petri con micelio de *Pleurotus ostreatus*.

Nota: Al momento de transferir los sustratos a los Erlenmeyers agitar constantemente el frasco donde se mezcló los componentes de los sustratos para evitar asentamientos por diferencia de densidades y así asegurar que la composición del sustrato no varíe, es aconsejable preparar la cantidad de sustrato necesario en forma directa en envases preestablecidos para evitar transferir a otro.

1. Sustrato A (Avena)

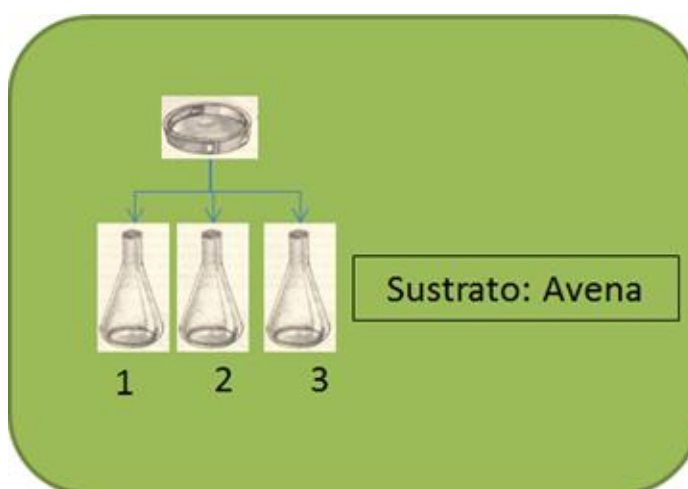


Figura 4: Sustrato A

2. Sustrato AP (Avena + Panela)

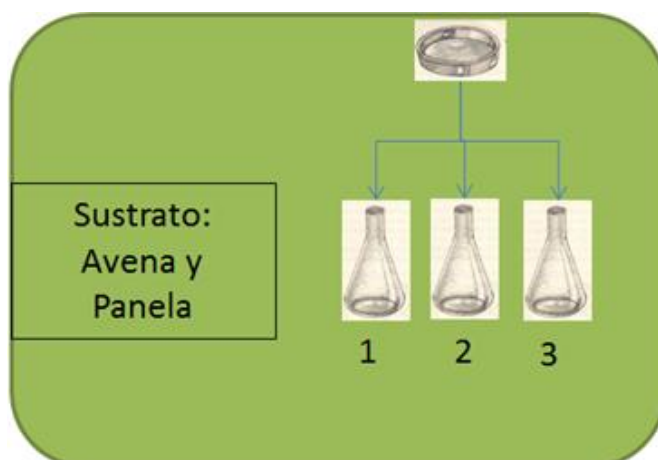


Figura 5: Sustrato AP

3. Sustrato C (Cebada)

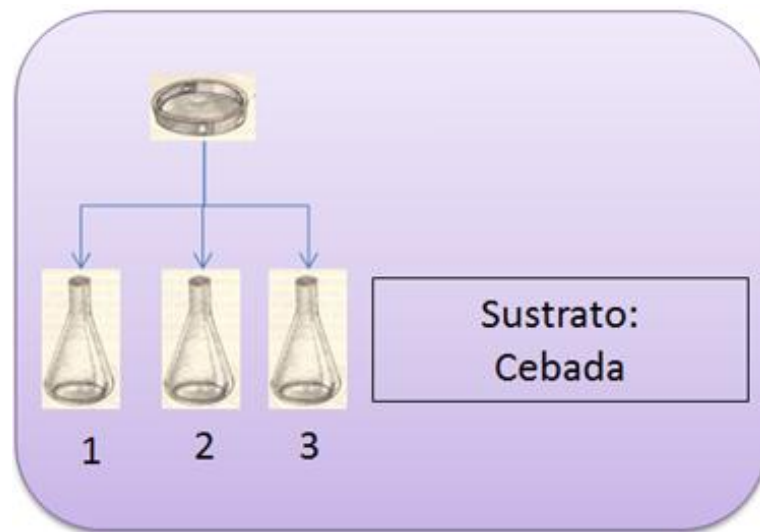


Figura 6: Sustrato C

4. Sustrato E (Solo Extracto de Levadura)

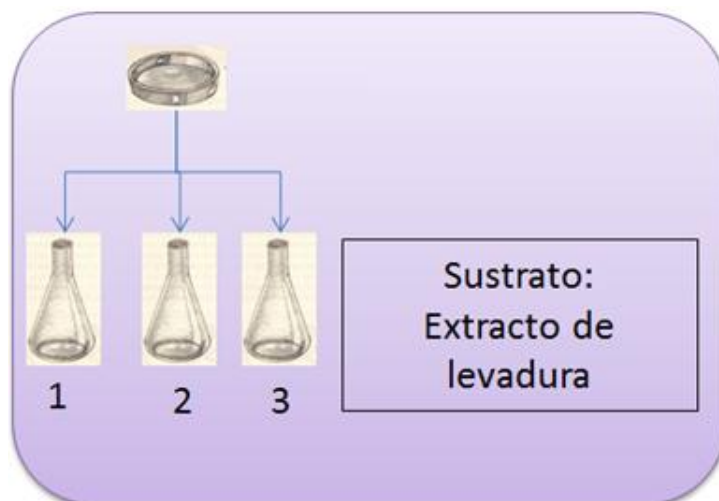


Figura 7: Sustrato E

3.2.3 Procedimiento 2 (sustrato hervido sin filtración)

- a. Colocar los componentes de los sustratos T, TP y TPE, en un frasco bien limpio con agua bi destilada.
- b. Agitar por tres minutos, repartir 50 mL en los erlenmeyers, llevar a punto de ebullición y dejar que se enfríe, este procedimiento se repite durante tres veces.
- c. Enfriar hasta temperatura ambiente y proceder a sembrar el inóculo obtenido de las cajas Petri con micelio de *Pleurotus ostreatus*.

5. Sustrato T (solo Afrecho de Trigo)

6. Sustrato TP (afrecho de trigo + panela)

7. Sustrato TPE (afrecho de trigo+ panela+ extracto de levadura)

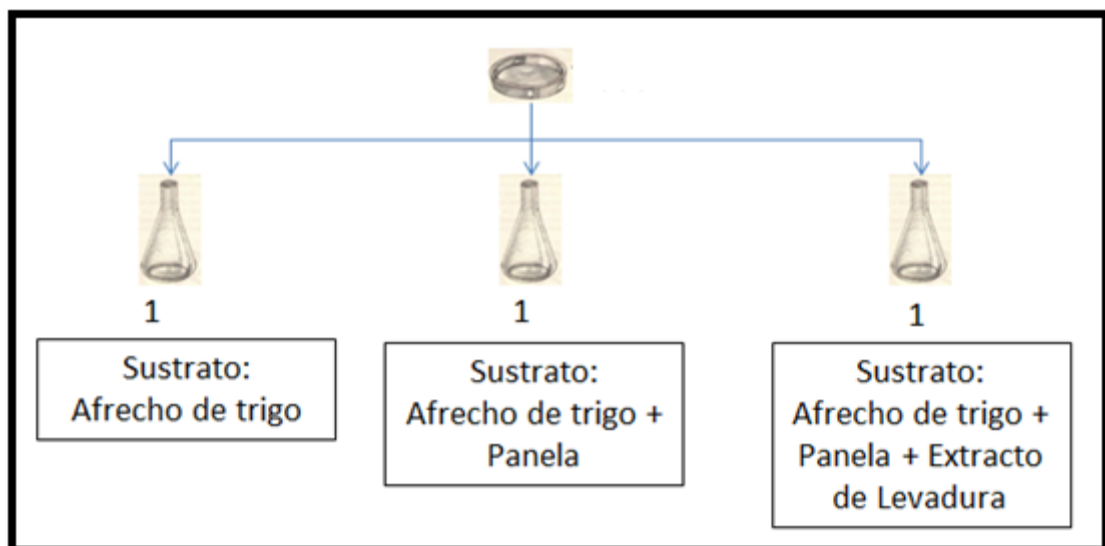


Figura 8: Sustratos T, TP, TPE.

3.2.4 Procedimiento 3 (filtración del sustrato)

- a. Colocar los componentes de los sustratos Ar & ArE, en un frasco bien limpio con agua bi-distilada.
- b. Agitar bien por tres minutos, llevar a punto de ebullición, filtrar en contenido del frasco y repartir en los erlenmeyers 50 mL.
- c. Esterilizar en la autoclave a 121 ° C a 1,1 atm de presión durante 15 minutos.
- d. Enfriar hasta temperatura ambiente y proceder a sembrar el inóculo obtenido de las cajas Petri con micelio de *Pleurotus ostreatus*.

8. Sustrato Ar (Afrecho de Arroz)

9. Sustrato ArE (Afrecho de Arroz + Extracto de Levadura)

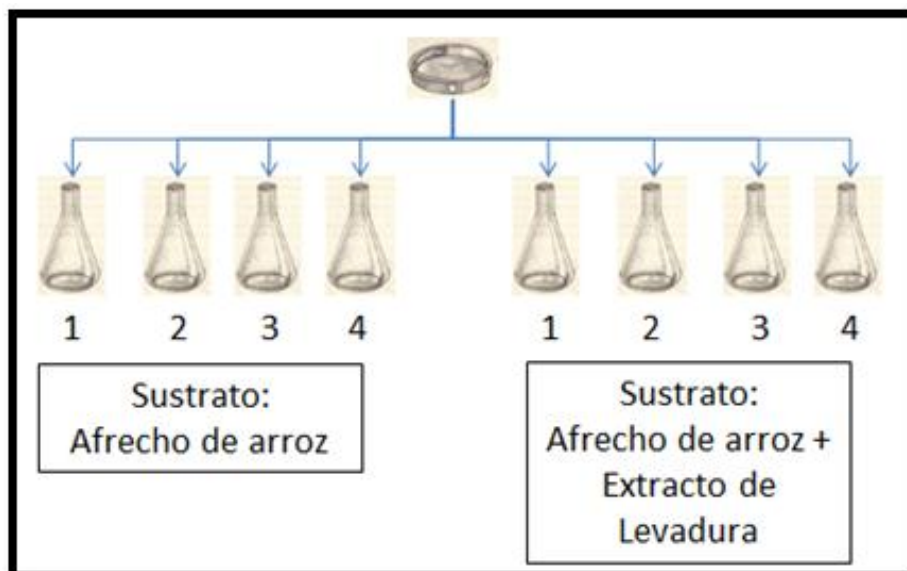


Figura 9: Sustratos Ar & ArE

3.3 PRUEBA DE CRECIMIENTO MICELIAL DE LÍQUIDO A SÓLIDO

Sembrar el inóculo líquido del cual se observó mejores resultados, en cajas con agar a diferentes tiempos de residencia en el medio líquido para determinar el mejor tiempo al que se debería inocular el suelo, obteniendo primero los porcentajes de crecimiento que se evidenciaban a través de los días.

3.4 DETERMINACIÓN DE BIOMASA EN MEDIO LÍQUIDO

Cuantificar La biomasa por método gravimétrico y determinar el peso seco.

3.4.1 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

- Papel filtro
- Embudo de vidrio
- Probeta de 100mL
- Vaso de precipitación de 150mL
- Balanza digital
- Estufa de cultivo
- Agua destilada

3.4.2 PROCEDIMIENTO

- a. Pesar el papel filtro (P_0).
- b. Tomar 100mL de inóculo líquido y filtrar.
- c. Lavar el micelio con agua bi-destilada

- d. Secar en una estufa el papel con el filtrado a 105°C por 1 hora.
- e. Poner en el desecador durante 30 minutos.
- f. Pesar el papel con el filtrado (P_f)
- g. Determinar la concentración.

3.4.3 CÁLCULOS

$$B_m = \frac{P_f - P_o}{V}$$

Dónde:

B_m = Concentración en gramos de masa fúngica por volumen

P_f = Peso del papel filtro con el filtrado

P_o = Peso del papel filtro

V = Volumen filtrado

Pesos de suelos

- a. Pesar el suelo homogenizado, obteniendo:

Peso total del suelo: 20,162 Kg

- b. Repartir equitativamente en cada unidad experimental

Peso de suelo en cada recipiente: 2,5 Kg

3.5 DISPOSICIÓN E INOCULACIÓN DE SUELOS EN LAS UNIDADES EXPERIMENTALES

3.5.1 MATERIALES EQUIPOS Y REACTIVOS

- Palita de jardinero
- Recipiente contenedor de inóculo
- Muestras de suelos esterilizados y sin esterilizar.
- Canastas de plástico
- Recubrimiento plástico transparente.

3.5.2 PROCEDIMIENTO

- a. Limpiar y desinfectar el espacio de trabajo.
- b. Tomar una muestra compuesta de suelo de las fundas según el tratamiento
- c. Disponer la misma cantidad de suelo en las tinas plásticas
- d. Agregar el inóculo líquido a las unidades experimentales, homogenizar lentamente las mismas y dejar actuar.

3.6 MUESTREO EN EL LABORATORIO

Para realizar los análisis en el laboratorio proceder a realizar un muestreo de cada unidad experimental, homogenizar la muestra y realizar un cuarteo tomándose el suelo de las esquinas y volver a repetir el procedimiento tomando así una muestra representativa.

Para el diagnóstico y caracterización del suelo tratar una muestra inicial lo más homogénea posible de cada unidad experimental antes de aplicar el inóculo líquido de *Pleurotus ostreatus*, el suelo caracterizarlo de acuerdo a los requerimientos de los límites permisibles de suelo agrícola de la TABLA 6 del RAHOE

3.7 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.7.1 DETERMINACIÓN DE METALES PESADOS (Cd, Ni, Pb)

La Espectrofotometría de absorción atómica se parece a la fotometría de llama de emisión en la que la muestra es aspirada en una llama y atomizada. La principal diferencia consiste en que la fotometría de llama se mide la cantidad de luz emitida, mientras que en la espectrometría de absorción atómica se dirige un rayo luminoso a través de una llama a un monocromador y sobre un detector que mide la cantidad de luz absorbida por el elemento atomizado en la llama.

Para determinados metales, la absorción atómica presenta una sensibilidad mayor a la emisión de la llama. Como cada metal tiene su propia longitud de onda de absorción característica, se utiliza como fuente luminosa una lámpara compuesta de dicho elemento; esto proporciona un método relativamente libre de interferencias espectrales o de radiación.

La cantidad de energía absorbida en la llama a una longitud de onda característica es proporcional a la concentración del elemento en la muestra, en un intervalo de concentraciones limitado.

CADMIO

1. Principio

Digestión Ácida, filtración y determinación por Espectrofotometría de Absorción Atómica –Llama, Aire- Acetileno

2. Referencia

Cadmio (Cd) PEE /LABCESTTA /76 Método de referencia EPA SW- 846 N 3050B, 7130. Ed.3, 1986

NÍQUEL

1. Principio

Digestión Ácida, filtración y determinación por Espectrofotometría de Absorción Atómica –Llama, Aire- Acetileno

2. Referencia

Níquel (Ni) PEE /LABCESTTA /77 Método de referencia EPA SW- 846 N 3050B, 7520. Ed.3, 1986

PLOMO

1. Principio

Digestión Ácida, filtración y determinación por Espectrofotometría de Absorción Atómica –Llama, Aire- Acetileno

2. Referencia

Plomo (Pb) PEE/LABCESTTA/78 Método de referencia EPA SW- 846 N 3050B, 7420.
Ed.3, 1986

PROCEDIMIENTO

- a. Secar la muestra por 2 horas en la estufa de 107 °.
- b. Pesar 1g de suelo tamizado y ponerlo en un Erlenmeyer.
- c. Agregar 10mL de Ácido Nítrico 1:1
- d. Digestar durante 15 minutos a 95° cubriendo el Erlenmeyer con un vidrio reloj.
- e. Adicionar 5mL de Ácido Nítrico concentrado al 65%.
- f. Digestar durante 2 horas.
- g. Agregar 2 mL de agua bi-destilada y 3mL de Peróxido de Hidrogeno.
- h. Digestar durante 2 horas y dejar enfriar.
- i. Filtrar y aforar en un balón de 50mL
- j. Medir en el equipo de Absorción Atómica.

3.7.2 DETERMINACIÓN DE HIDROCARBUROS TOTALES DE PETRÓLEO

1. Principio

Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPH), por cromatografía de gases.

Este método se basa en la extracción con n-hexano, seguido por cromatografía de gases y detección por ionización de flama. La concentración de TPH's es reportado como la sumatoria de todo rango de carbono; ejemplo nC7 o nC35.

2. Referencia

PEE/LABCESTTA /26 Método de referencia TNRCC 1005, Junio 2001.

3.7.3 DETERMINACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS

1. Principio

Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP's), por cromatografía HPLC.

Este método se basa en la extracción de la muestra mediante Soxhlet con diclorometano y el extracto después de un proceso de concentración y purificación es analizado mediante HPLC. El detector de fluorescencia se utilizó complementariamente al HPLC para efectuar la detección e identificación de los HAP's seleccionados.

El proceso de purificación, limpieza o clean up se llevó a cabo en columna de gel de sílice para favorecer la eliminación de interferencias. Esta purificación del extracto de muestra, es considerada para los casos que lo ameritan es decir siempre y cuando la muestra presente coloración o se evidencie como un extracto sucio.

2. Referencia

PEE/LABCESTTA /23 Método de referencia EPA SW- 846 N 8310. Ed. 3, 1986 EPA
SW- 846 N 3540, 1992

PROCEDIMIENTO

- a. Poner a secar la muestra al ambiente.

- b. Moler la muestra y tamizar.
- c. Pesar 2 g de suelo tamizado en tubo HACH.
- d. Agregar 5 ml de N-Hexano GC en la muestra de suelo.
- e. Agitar durante 1 minuto en el agitador Vortex Mixer.
- f. Situar en el sonificador ultrasonido por 5 minutos
- g. Centrifugar por 1 minuto.
- h. Extraer la muestra y colocar la muestra extraída en un vial.
- i. Medir en el Cromatógrafo de gases.

3.7.4 DETERMINACIÓN DE pH

1. Principio

La medición de pH de un suelo, usando potenciómetro y electrodos de vidrio se basa en la medición del potencial eléctrico que se crea en la membrana de vidrio del mismo, lo cual es función de las actividades de iones hidrógeno a ambos lados de la membrana.

En este procedimiento, donde la medición del pH se hace en suspensión el contenido de humedad no guarda una relación definida con las condiciones de campo y lo que en realidad se determina es el pH de la solución, cuya concentración de iones hidrógeno entra en equilibrio con los iones de hidrógeno en el suelo.

2. Referencia

PEE/LABCESTTA/24 Método de referencia: EPA 9045 D. 2004

3.7.5 DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD

Determinación gravimétrica por diferencia de pesos pesando la muestra antes de ser secada, y luego de seca.

3.7.6 DETERMINACIÓN DE TEMPERATURA

Los átomos y moléculas en una sustancia no siempre se mueven a la misma velocidad. Esto significa que hay un rango de energía (energía de movimiento) en las moléculas

La temperatura es una medida del calor o energía térmica de las partículas en una sustancia.

Como lo que medimos en su movimiento medio, la temperatura no depende del número de partículas en un objeto y por lo tanto no depende de su tamaño.

CAPITULO IV

4. RESULTADOS

4.1. FORMULACIÓN DE LOS SUSTRATOS LÍQUIDOS DONDE SE PUEDA DESARROLLAR EL HONGO CON LOS NUTRIENTES NECESARIOS

Se realizó la formulación de 9 sustratos con combinaciones y pesos diferenciados.

Se utilizaron tres variantes de preparación de sustratos: sustrato autoclavado sin filtrar, sustrato hervido sin filtrar y sustrato filtrado autoclavado, todas en condiciones asépticas y utilizando material adecuado.

Tabla VI: Aceptación de la preparación de sustratos

Procedimiento/Técnica preparación de sustratos	Resultados	Aceptación
Sustrato Autoclavado sin filtrar	No presenta contaminación en el proceso de cultivo, buen desarrollo de pellets, la turbiedad disminuye.	+
Sustrato Hervido sin Filtrar	Presenta contaminación durante el proceso de cultivo, acidificación del medio de cultivo, no has desarrollo de pellets, la turbiedad aumenta.	-
Sustrato Filtrado Autoclavado	No presenta contaminación, no presenta buen desarrollo de pellets, la turbiedad es permanente	+/-

Fuente: Datos del autor

El proceso de preparación que dio mejores resultados fue el sustrato autoclavado sin filtrar como se indica en la Tabla VI; ya que mediante este proceso se aseguró que el medio de cultivo en el que se iba a inocular esté estéril, técnica utilizada por AGUILAR L. quien esterilizó sus medios de cultivo a 121 °C en autoclave, tomando en consideración que la preparación de los sustratos es parte esencial en la investigación ya que el sustrato debe tener consistencia blanda, no debe formar grumos demasiado grandes, la mezcla debe ser lo suficientemente homogénea para asegurar que el micelio siempre encuentre nutrientes disponibles, el pH no debe ser muy ácido ni muy alcalino en lo posible tratar de mantener un pH estable y que no tenga variaciones bruscas sino paulatinas.

4.2. SELECCIÓN DEL MEJOR SUSTRATO DE ACUERDO A LAS CARACTERÍSTICAS DE CRECIMIENTO QUE SE OBTENGA

En la Tabla VII se presentan los resultados de la medición de biomasa generada en los diferentes sustratos en función del tiempo, donde influyeron factores como la composición de los sustratos la cual es determinante para el crecimiento de micelio de *Pleurotus ostreatus* en medio líquido y su respectiva biomasa.

Tabla VII: Medición de biomasa generada en los sustratos en diferentes tiempos

	A	AP	C	E	T	TP	TPE	Ar	ArE
t1	S/M	S/M	S/M	S/M	S/M	S/M	S/M	S/M	S/M
t2	B/M	B/M	S/M	S/M	S/M	S/M	S/M	B/M	B/M
t3			S/M	S/M	B/M	B/M	B/M		
t4			B/M	B/M					

Análisis estadístico

Se utilizó la ANOVA (Análisis de Varianza de Dos Factores).

Comparando la influencia del Tipo de Sustrato y los Tiempos de Residencia (tiempo al que se realizó la medición) sobre la Biomasa.

Anova Dos Factores

Variable Respuesta: BIOMASA
Variable(s) Explicativa(s): SUSTRATO, TIEMPO
Número de Casos: 108

Anova

	Suma de Cuadrados	G.L.	Cuadrado Medio	F-valor	p-valor
SUSTRATO	14564.1188	8	1820.5148	111.2502	0.0002E-33
TIEMPO	1405.1357	3	468.3786	28.6222	0.0003E-8
SUSTRATO*TIEMPO	5935.6310	24	247.3180	15.1134	0.0002E-15
Residual	1178.2191	72	16.3642		
Total (corr.)	23083.1045	107			

Figura 10: Significancia de las Variables en el estudio de viabilidad

Estos valores indican una significancia muy grande comparando la influencia que existe por parte del sustrato y tiempo de cultivo en la cantidad de biomasa obtenida, al hacer la comparación entre la interacción que tienen estos dos factores confirman que tanto sustrato como tiempo influyen en el crecimiento micelial del hongo *Pleurotus ostreatus*.

Al realizar las comparaciones múltiples tanto con **LSD** “Mínima diferencia significativa” como con **HSD de TUKEY** “Diferencia Honestamente Significativa”; obtenemos que los valores de las medias al 95% de confianza presenta diferencias significativas entre sí, siendo los sustratos “Avena” y “Arroz de Cebada” los más heterogéneos como se observa en la Figura 11. Esta prueba determino la elección de estos dos sustratos para continuar con la investigación.

Anova Dos Factores. Comparaciones Múltiples

Variable Respuesta: BIOMASA
Variable(s) Explicativa(s): SUSTRATO, TIEMPO
Número de Casos: 108

Modelo sin interacciones

con I.C. HSD de Tukey al 95.0%

SUSTRATO	n	Media	Grupos Homogéneos
AFRECHODETRIGOPANELA	12	-0.0010E-11	X
AFRECHODETRIGOPANELAEXTRACTODELEVADURA	12	-0.0010E-11	X
AFRECHODETRIGO	12	0.0004E-11	X
EXTRACTODELEVADURA	12	2.1871	X X
AFRECHODEARROZ	12	4.7607	X X
AFRECHODEARROZEXTRACTODELEVADURA	12	12.3222	X X
AVENAPANELA	12	23.0247	XX
AVENA	12	25.8475	X
ARROZDECEBADA	12	30.1662	X

Figura 11. Nivel de Confianza al 95%

Para la elección del sustrato cuyas características permiten continuar con la investigación se tomó en cuenta los siguientes aspectos: el tiempo en semanas en las que se revisó los sustratos, medición de la biomasa, el consumo del sustrato (la solución

del sustrato se tornó más clara o transparente), y el aparecimiento de pellets bien definidos.

La tabla VIII indican los resultados sustrato, tiempos, biomasa y aptitud del cultivo de *Pleurotus ostreatus* en medio líquido.

Tabla VIII: Resultados Sustratos, Tiempos, Biomasa y Aptitud

	Descripción	Código	Tiempo de Medición de Biomasa	g/L	Media g/L	Días transcurridos	Observación
1	Avena	A	Dos semanas	24,134	25,9673	6	Apto/ Pellets bien definidos
	Avena	A	Dos semanas	33,864		6	Apto/ Pellets bien definidos
	Avena	A	Dos semanas	19,904		6	Apto/ Pellets bien definidos
2	Avena + Panela	AP	Dos semanas	35,406	25,771	8	Apto/ Pellets bien definidos
	Avena + Panela	AP	Dos semanas	20,664		8	Apto/ Pellets bien definidos
	Avena + Panela	AP	Dos semanas	21,243		8	Apto/ Pellets bien definidos
3	Arroz de cebada	C	Cuatro semanas	62,642	61,557	27	No Apto/ sin pellets/Crecimiento Superficial
	Arroz de cebada	C	Cuatro semanas	60,592		27	No Apto/ sin pellets/Crecimiento Superficial
	Arroz de cebada	C	Cuatro semanas	61,437		27	No Apto/ sin pellets/Crecimiento Superficial
4	Extracto de levadura	E	Cuatro semanas	3,404	3	27	No Apto/ sin pellets
	Extracto de levadura	E	Cuatro semanas	2,174		27	No Apto/ sin pellets
	Extracto de levadura	E	Cuatro semanas	3,422		27	No Apto/ sin pellets
5	Afrecho de trigo	T	Cuatro semanas	0	0	20	No Apto/sin Pellets/ Solo se pasteurizó

(Continuación de la Tabla VIII. Resultados Sustratos, Tiempos, Biomasa y Aptitud)

6	Afrecho de trigo + Panela	TP	Cuatro semanas	0	0	20	No Apto/sin Pellets/solo se pasteurizó
7	Afrecho de trigo + Panela+ Extracto de levadura	TPE	Cuatro semanas	0	0	20	No Apto/sin Pellets/solo se pasteurizó
8	Afrecho de arroz	Ar	Dos semanas	5,25	3,923	5	Apto/ Pellets bien definidos
	Afrecho de arroz	Ar	Dos semanas	7,398		5	Apto/ Pellets bien definidos
	Afrecho de arroz	Ar	Dos semanas	1,15		5	Apto/ Pellets bien definidos
	Afrecho de arroz	Ar	Dos semanas	1,894		5	Apto/ Pellets bien definidos
9	Afrecho de Arroz +Extracto de levadura	ArE	Dos semanas	13,958	13,958	5	Apto/ Pellets bien definidos
	Afrecho de Arroz +Extracto de levadura	ArE	Dos semanas	13,328		5	Apto/ Pellets bien definidos
	Afrecho de Arroz +Extracto de levadura	ArE	Dos semanas	10,546		5	Apto/ Pellets bien definidos
	Afrecho de Arroz +Extracto de levadura	ArE	Dos semanas	15,2		5	Apto/ Pellets bien definidos

Se discriminaron los sustratos arroz de cebada, extracto de levadura, afrecho de trigo, afrecho de trigo + avena, afrecho de trigo + avena + extracto de levadura por no presentar un buen desarrollo y definición de los pellets. Se aceptaron los sustratos avena, avena + panela, afrecho de arroz, afrecho de arroz + extracto de levadura por ser los que mejor presentaron el desarrollo micelial y definición de los pellets.

El sustrato Arroz de cebada presentó el valor de biomasa más alto 61,557 g/L, sin embargo las características del cultivo no fueron las adecuadas, ya que no hubo presencia de pellets sino un crecimiento superficial y no se evidenció el cambio de tonalidad del sustrato

De los sustratos estudiados se aceptó al sustrato “AVENA” como el de mejor característica para la investigación, ya que presentó un buen desarrollo de biomasa (25,97 g/L en dos semanas), presenta una buena generación de pellets, bien definidos y con una consistencia fuerte, el sustrato es consumido en su mayoría, y el cambio de tonalidad pasó de turbio a transparente en 6 días. La comparación de los sustratos en función de biomasa y tiempo se expresan en el Grafico 1 y fotografía 1.

Como segunda opción se podría considerar también al sustrato Avena + panela para fines de investigación ya que presenta una buena formación de biomasa.

AGUILAR L. trabajó con sustratos en diferentes combinaciones utilizando azúcar de remolacha, extracto de malta y extracto de levadura los cuales tenían una alta concentración de carbono, utilizó medios sólidos para el cultivo micelial y dio pautas para el cultivo y obtención de inóculo primario así como las características de un buen cultivo micelial, recomendando en su investigación que se podría trabajar en la utilización de medios líquidos.

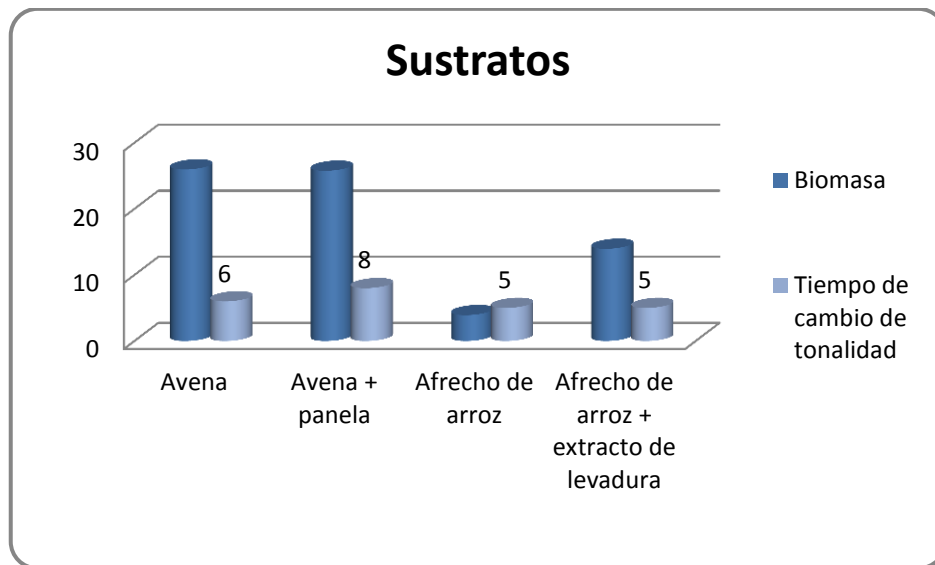
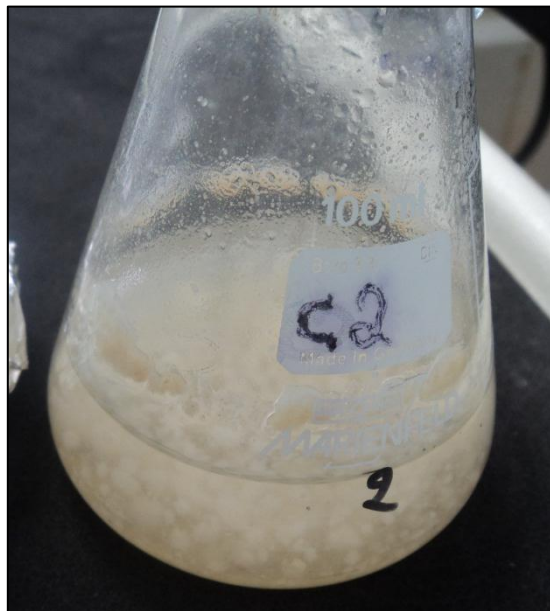


Gráfico 1: Sustratos que presentaron el mejor desarrollo de los pellets



Fotografía 1. Sustrato de Avena con desarrollo de pellets

4.3. CARACTERIZACION DEL SUELO CONTAMINADO

4.3.1. Obtención del material (suelo) sujeto a remediación con el hongo *Pleurotus ostreatus*

La población total (N) a estudiar fue de 135 suelos residuales y mediante muestreo aleatorio simple se tomaron 40 suelos (n) que fueron homogenizados para el proceso de remediación.

4.3.2 Caracterización inicial del suelo

Para la caracterización del suelo en los ocho tratamientos a investigar, se tomó en cuenta los parámetros de la tabla 6 del RAOHE que son Hidrocarburos Totales de Petróleo (THP), Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP's) y los metales Cadmio (Cd), Níquel (Ni), y Plomo (Pb), y los resultados obtenidos se exponen en la tabla VIII.

Tabla IX: Caracterización del suelo a tratar, parámetros tabla 6 RAOHE

	TPH mg/kg	HAP's mg/kg	Cd mg/kg	Ni mg/kg	Pb mg/kg
	Análisis 1	Análisis 1	Análisis 1	Análisis 1	Análisis 1
T1 U1	23282,91	1,25	< 0,8	< 30	< 20
T1 U2	20088,83	0,58	< 0,8	< 30	< 20
T1 U3	25329,16	0,77	< 0,8	< 30	< 20
T1 B	5554,73	< 0,3	< 0,8	< 30	< 20
T2 U1	9407,07	< 0,3	0,92	< 30	< 20
T2 U2	7883,15	< 0,3	2,46	< 30	< 20
T2 U3	32206,45	1,5	< 0,8	< 30	< 20
T2 B	42681,16	2,18	< 0,8	< 30	< 20
Límite	2500	2	2	50	100

Tabla X. Límites permisibles para la identificación y remediación de suelos contaminados en todas las fases de la industria hidrocarburífera, incluidas las estaciones de servicios.

Parámetro	Expresado en	Unidad	Uso Agrícola	Uso Industrial	Ecosistemas Sensibles
Hidrocarburos totales de Petróleo	TPH	mg/Kg	<2500	<4000	<1000
Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos	HAPs	mg/Kg	<2	<5	<1
Cadmio	Cd	mg/Kg	<2	<10	<1
Níquel	Ni	mg/Kg	<50	<100	<40
Plomo	Pb	mg/Kg	<100	<500	<80

Fuente: Tabla 6 - RAOHE, Decreto Ejecutivo N° 1215, Registro Oficial 265 de 13- 02- 2001

En la caracterización inicial, los valores de TPH son altos en todas las unidades experimentales, siendo la unidad T2B quien presenta los valores de contaminación más altos comparándolos con los límites permisibles indicados en la Tabla X tomados de la tabla 6 de la RAOHE; el TPH de 42681,16 mg/kg y los HAP's 2,18 mg/kg sobrepasan los límites permisibles para su disposición final en suelos agrícolas.

El valor de cadmio en el tratamiento T2U2 de 2,46 mg/kg sobrepasa el límite permisible de 2 mg/kg para suelos agrícolas; en los demás unidades experimentales los valores de metales pesados se encuentran dentro de los límites permisibles para la disposición final en suelos agrícolas, suelos industriales y ecosistemas sensibles.

4.4. BIORREMEDIACION DEL SUELO CONTAMINADO CON LOS INÓCULOS LÍQUIDOS DE *Pleurotus ostreatus*.

4.4.1 PRUEBA PRELIMINAR SIEMBRA DE INOCULO LÍQUIDO EN CAJAS CON AGAR PREVIO A INOCULAR EN EL SUELO

Para comenzar con el proceso de Biorremediación se realizó una pre prueba la cual consistió en sembrar inóculo líquido, en cajas con agar a diferentes tiempos de residencia en el medio líquido para determinar el mejor tiempo al que se debería inocular el suelo, obteniendo los porcentajes de crecimiento que se evidenciaban a través de los días.

Como se puede observar en las tabla XII los porcentajes de invasión de micelio al ser sembrado con un mayor tiempo de maduración o residencia en el medio de cultivo es mejor ya que tiene un mayor desarrollo e invade la caja Petri con medio de cultivo solido en menos días frente a los porcentajes obtenidos en la Tabla XI que indican la siembra a los 2 días de hacer el inoculo líquido, los mismos que fueron sembrados a un menor tiempo de residencia y no alcanzaron la maduración necesaria para acondicionarse al nuevo medio de cultivo siendo el tiempo de invasión mayor.

Tabla XI: Siembra a los 2 días de hacer el inóculo líquido

	Caja 1	Caja 2
Día	Porcentaje	Porcentaje
1	0	0
5	1	0,5
6	2	1
9	95	60
12	100	60
14	100	60
19	100	60
23	100	60
46	100	100

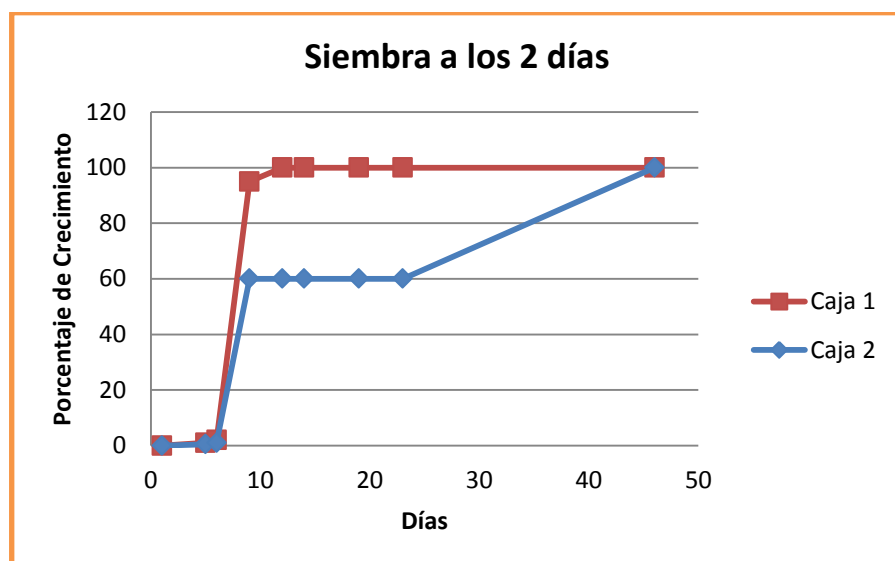


Gráfico 2: Porcentaje de crecimiento en cajas Petri de inóculo de dos días

Tabla XII: Siembra a los 6 días de hacer el inóculo líquido

	Caja 1	Caja 2
Día	Porcentaje	Porcentaje
1	0	0
2	15	1
5	45	3
8	99	75
10	100	95
15	100	100
19	100	100
42	100	100

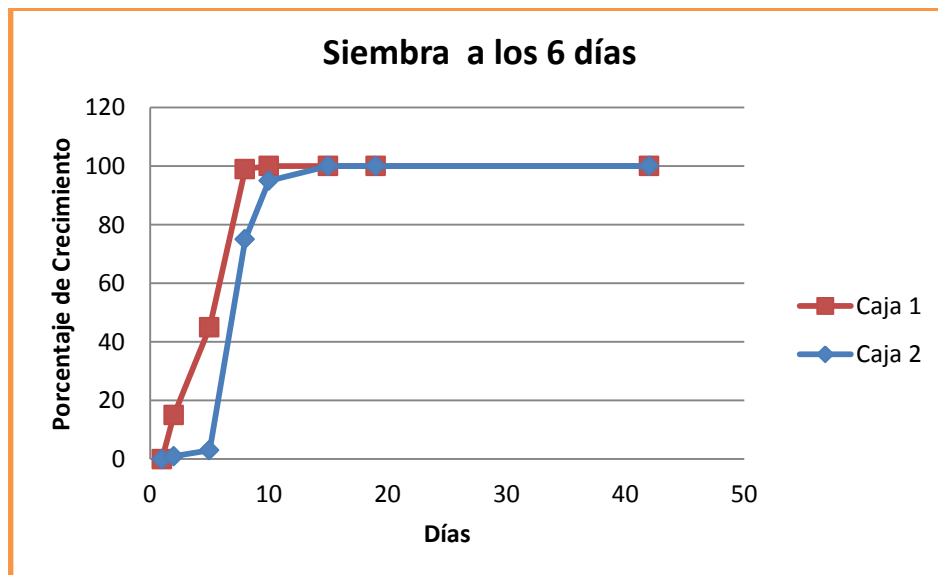


Gráfico 3: Porcentaje de crecimiento en cajas Petri de inóculo de seis días



Fotografía 2: Prueba de Siembra Líquida en cajas con Agar



Fotografía 3: Cajas invadidas totalmente con Micelio de *Pleurotus ostreatus* sembrado en inóculo líquido.

4.5 SEGUIMIENTO DE LAS VARIABLES DE CONTROL

4.5.1 TEMPERATURA Y HUMEDAD AMBIENTAL

Se registraron los valores de temperatura y humedad ambiental durante el tiempo de incubación del micelio obteniéndose valores entre 19 - 24 °C de temperatura y 50-54 % de humedad. Estos valores no inciden y no son representativos en la investigación ya que los cambios que se dieron fueron paulatinos y los medios de cultivo no se vieron afectados. Los gráficos de los valores obtenidos se presentan a continuación.

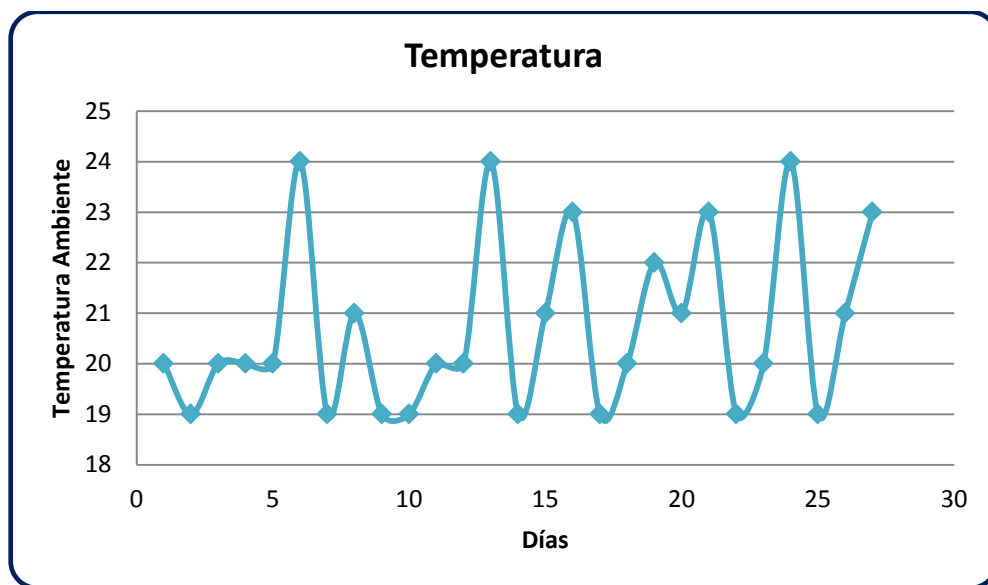


Gráfico 4: Variación de Temperatura durante la investigación

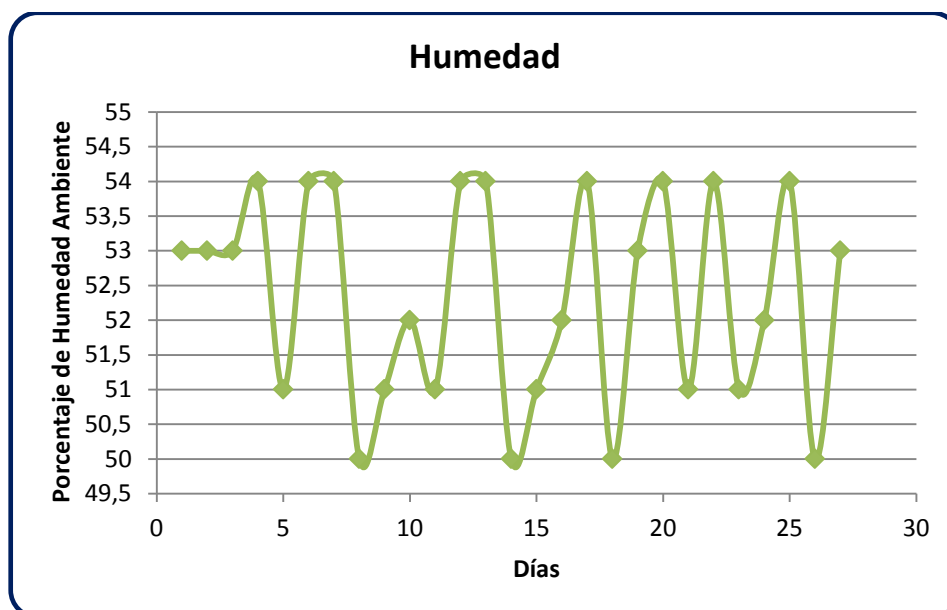


Gráfico 5: Variación de la Humedad durante la Investigación

4.5.2 TEMPERATURA Y HUMEDAD EN TRATAMIENTOS Y TIEMPO DE BIORREMEDIACION

Se registró el control de la humedad y temperatura durante 100 días que duró del proceso de biorremediación, ver Anexo 21 registro de temperaturas durante el proceso de biorremediación

La temperatura en las unidades experimentales como se observa en el Grafico 6. Registro de temperatura, se inicia con una temperatura de 14,5 °C; a partir de los 15 días de inoculación y a medida que aumenta el tiempo de residencia del hongo en el sustrato la temperatura se incrementa a valores superiores a los 19°C. La temperatura máxima registrada es de 20,8 °C en el día 37 en el tratamiento T1U1.

El rango de temperatura de trabajo está comprendido entre 15-40° C como lo indica ARROYO M.-QUESADA R. para las condiciones óptimas, que se aplican en sistemas de biorremediación de suelos y aguas contaminadas por Hidrocarburos.

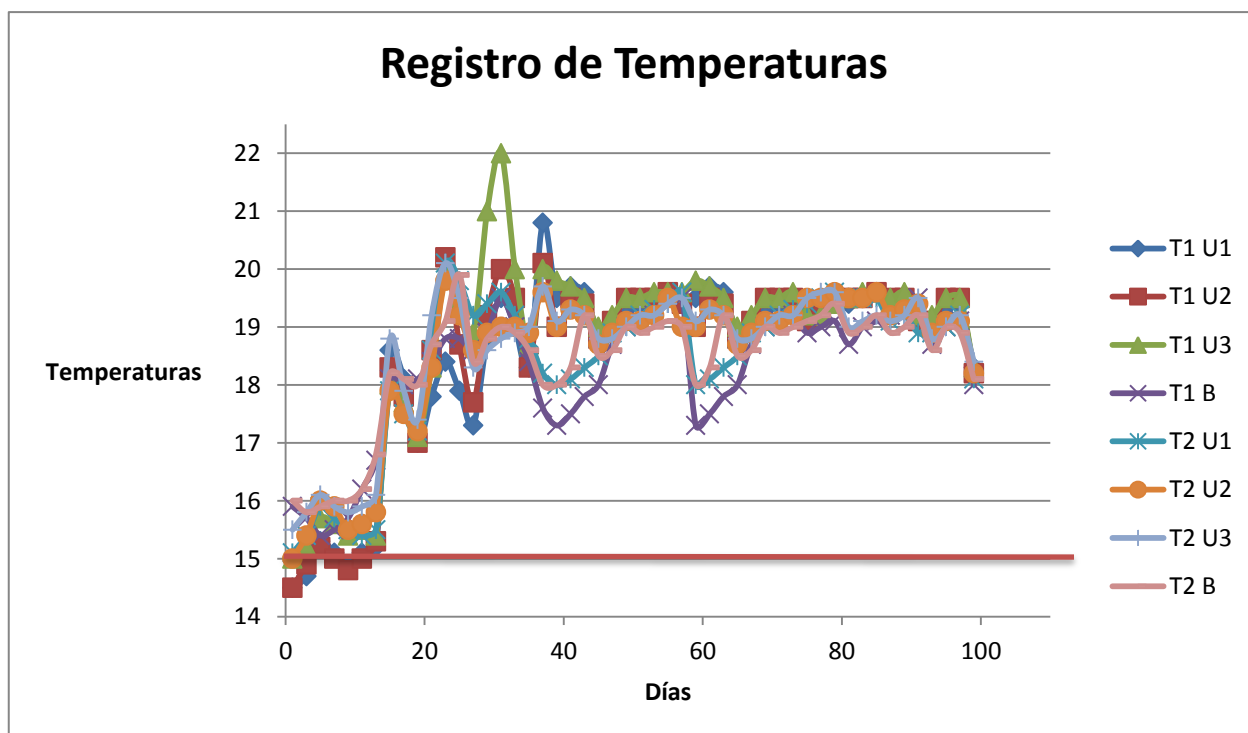


Gráfico 6: Temperaturas de las Unidades experimentales

La humedad en las unidades experimentales presenta valores entre 29,98 % a 45,36 %. Se inicia con un valor medio del 30,0% y supera el 40,0% a partir del 12 día alcanzando su máximo valor el día 92 con una media de 45,0% de humedad como se observa en el Grafico 7. Registro de Humedad.

GOMEZ S. y otros mencionan que es conveniente tener valores de humedad del suelo entre 25 y 75 % para que los microorganismos se desarrollen favorablemente, lo cual se diferencia notablemente con los valores de 50-80% mencionados por GARZON J. y

otros ya que estos son los óptimos para cultivo y obtención de cuerpo fructífero del hongo *Pleurotus ostreatus*. Ver anexo 22 registros de humedades durante el proceso de biorremediación.

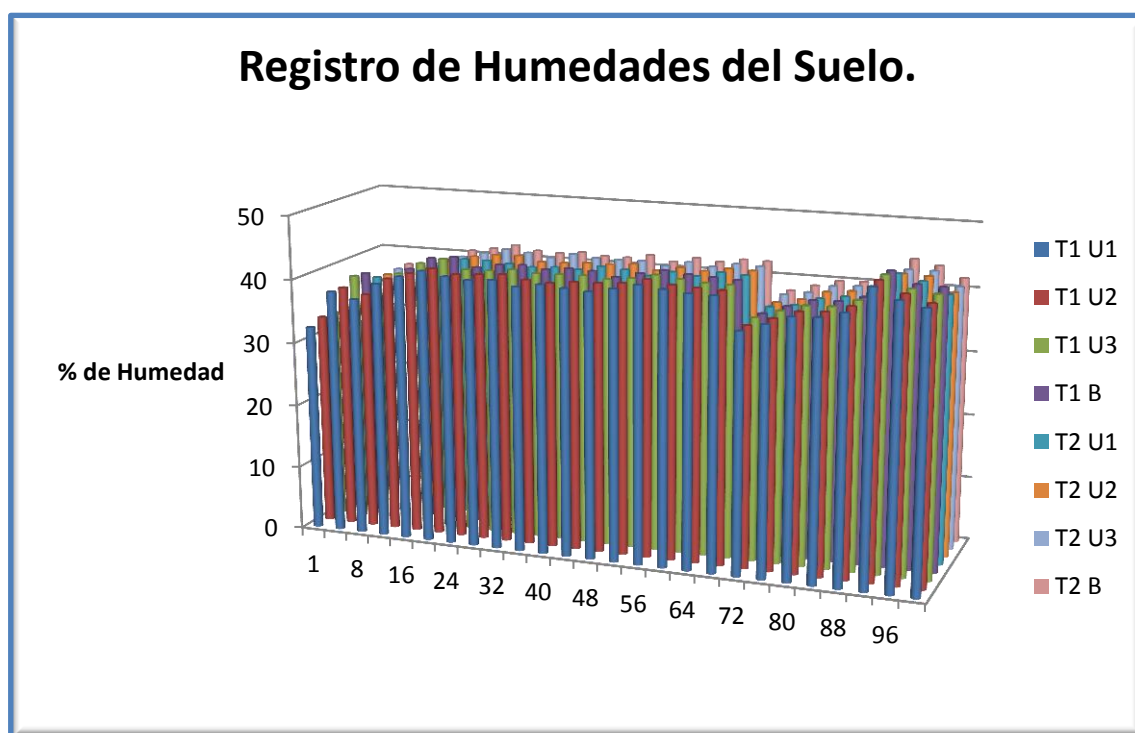


Gráfico 7: Porcentaje de Humedad de las Unidades Experimentales

4.5.3 pH EN TRATAMIENTOS DE BIORREMEDIACION

El pH del suelo durante el tratamiento de biorremediación se mantiene constante fluctuando entre 6,54 y 7,94 como se evidencia en la Tabla XIII y Gráfico 8. GOMEZ S. Indica que los valores de pH del suelo adecuados a los que se puede dar un proceso de biorremediación donde los microorganismos no sufran estrés por ende disminución de la población, están entre 6-8 unidades de pH, por lo que nuestro proceso se desarrolló correctamente.

Tabla XIII: pH durante el experimento Tratamientos 1 y 2

Día	T1	T2
1	7,65	7,94
8	6,54	6,92
15	7,09	7,43
22	6,82	7,18
29	6,86	7,01
36	7,26	7,03
43	6,87	6,73
50	7,05	6,97
57	7,03	6,94
64	7,04	7,01
71	7,01	6,96
78	7,02	7,06
85	7,43	7,60
92	7,45	7,77
99	7,61	7,69

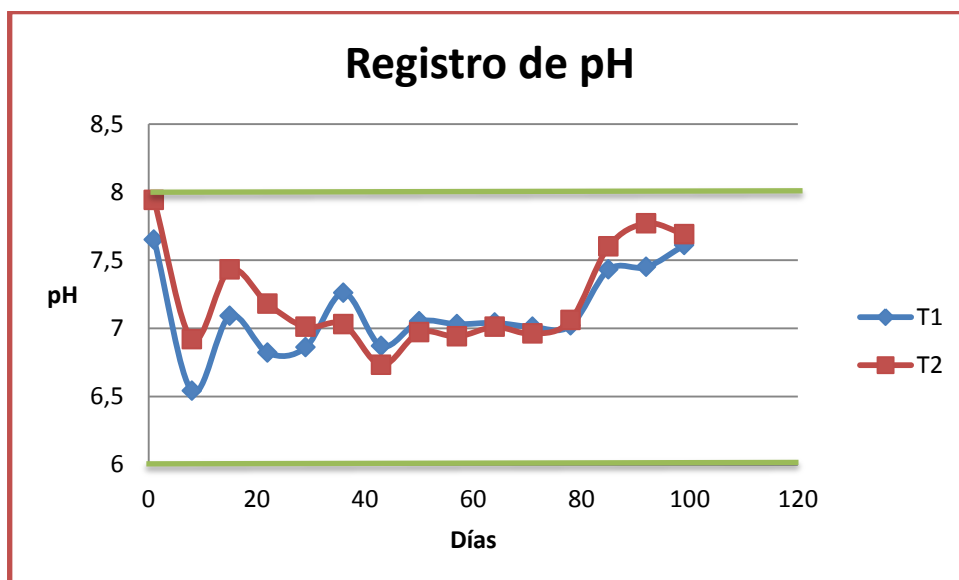


Gráfico 8: pH de los Tratamientos 1 y 2

4.6 CONTROL DE PARAMETROS DURANTE LA BIORREMEDIACION

Se analizó las unidades experimentales al mes de realizada la inoculación a los sustratos con el suelo contaminado obteniéndose los resultados indicados en la tabla XIV.

Tabla XIV: Resultados de parámetros analizados al mes de tratados con inóculo líquido.

	TPH	HAP's	Cd	Ni	Pb
	Análisis 2	Análisis 2	Análisis 2	Análisis 2	Análisis 2
T1 U1	7878,16	< 0,3	< 0,8	< 30	< 20
T1 U2	6324,78	< 0,3	< 0,8	< 30	< 20
T1 U3	8054,21	< 0,3	< 0,8	< 30	< 20
T1 B	5001,52	< 0,3	< 0,8	< 30	< 20
T2 U1	3298,67	< 0,3	< 0,8	< 30	< 20
T2 U2	2280,99	< 0,3	1,03	< 30	< 20
T2 U3	7173,46	< 0,3	1,09	< 30	< 20
T2 B	18413,04	< 0,3	1,03	< 30	< 20
Límite	2500	2	2	50	100

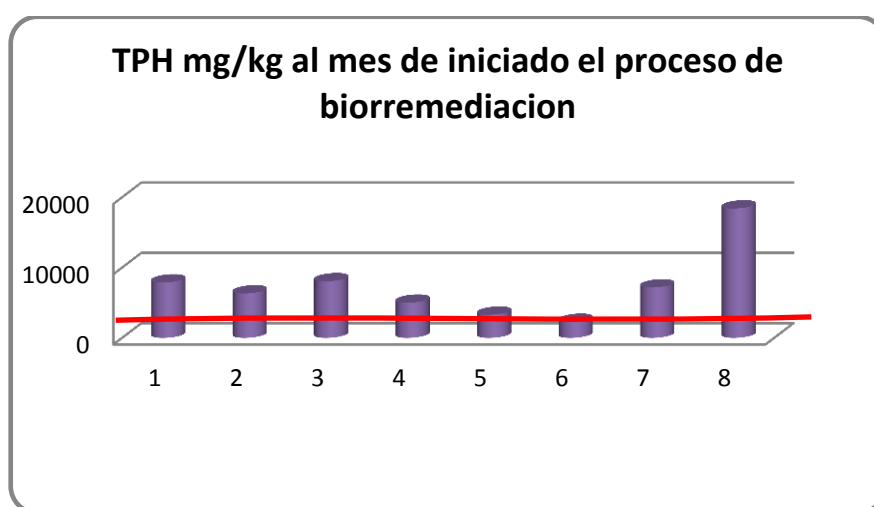


Gráfico 9: Variación de TPH al mes de iniciado el proceso de biorremediación

En el Grafico 9, podemos observar como evolucionaron los contaminantes al cabo de un mes de iniciado el tratamiento, se evidencia que el TPH en el tratamientos T2U2 2280.99 mg/kg, se encuentran por debajo del límite de disposición final de 2500,0 mg/kg hacia el suelo agrícola, mientras que los demás tratamientos aun no alcanzan el limite permisible, los valores de metales pesados se encuentran dentro de norma.

Se realizó la caracterización final de las unidades de experimentación dando los resultados expresados en la tabla XIV.

Tabla XV: Resultados de parámetros analizados al final de realizada la biorremediación

	TPH	HAP's	Cd	Ni	Pb
	Análisis 3	Análisis 3	Análisis 3	Análisis 3	Análisis 3
T1 U1	2303,93	< 0,3	< 0,8	< 30	< 20
T1 U2	2396,27	< 0,3	< 0,8	< 30	< 20
T1 U3	2011,22	< 0,3	< 0,8	< 30	< 20
T1 B	3170,27	< 0,3	< 0,8	< 30	< 20
T2 U1	893,12	< 0,3	< 0,8	< 30	< 20
T2 U2	1008,68	< 0,3	< 0,8	< 30	< 20
T2 U3	857,41	< 0,3	< 0,8	< 30	< 20
T2 B	3250,75	< 0,3	< 0,8	< 30	< 20
Límite	2500	2	2	50	100

En el Grafico 10., podemos observar los resultados finales para esta investigación, obteniendo valores de TPH en las unidades experimentales por debajo de la norma para suelo agrícola (2500,0 mg/kg) alcanzados luego del tratamiento con *Pleurotus ostreatus*. En las unidades experimentales blanco T1B y T2B el TPH es superior a lo solicitado en norma para la disposición final en suelos agrícolas pero inferior para uso en suelos industriales. Se obtuvo mejores resultados de biodegradación del parámetro

TPH en las unidades experimentales del tratamiento 2. Los parámetros de HAP's, y metales pesados se encuentran dentro de norma.

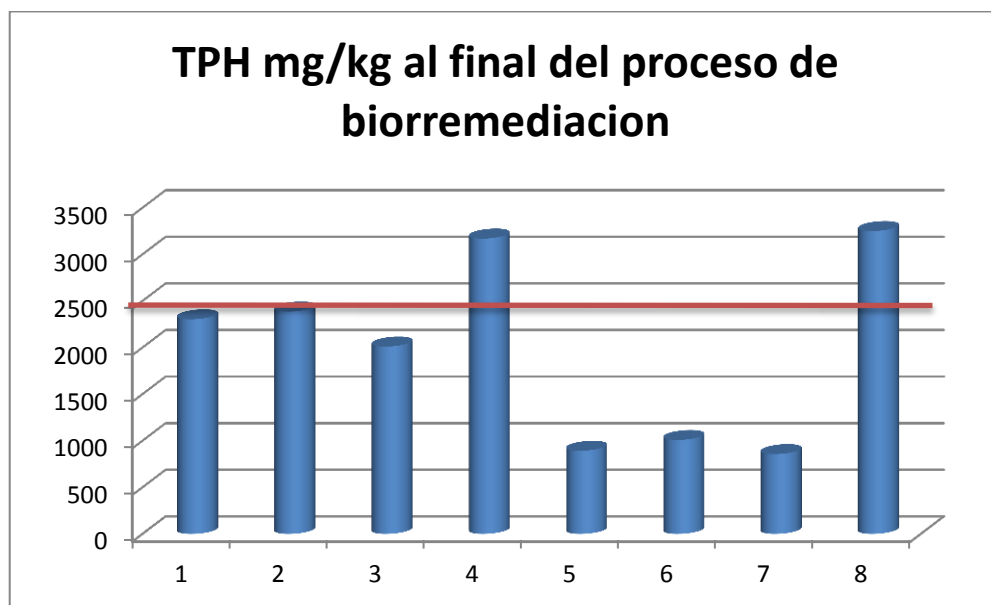


Gráfico 10. Resultado de TPH al final del proceso de biorremediación

4.7 PORCENTAJE DE EFICACIA DEL PROCESO DE BIORREMEDIACION

4.7.1 TPH

La reducción del parámetro TPH es el más representativo en esta investigación, ya que superó considerablemente el límite permisible indicado en la Tabla 6 de la RAOHE, de la caracterización inicial a los resultados al primer mes de iniciado el proceso de degradación se obtiene una eficiencia del 71.24%; esto se debe a la volatilización de la

fracción liviana del petróleo C₄ - C₁₂ presente. Durante las siguientes semanas, la disminución es más lenta debido ya que la degradación se realiza en la fracción pesada de petróleo.

Al final del proceso de biodegradación se aprecia un incremento del porcentaje de eficiencia del TPH como se observa en la Tabla XVI. El porcentaje de eficiencia en las unidades experimentales de los dos tratamientos supera el 92,06 % con un máximo del 97,34% en el tratamiento T2U3, demostrando de esta forma que utilizando el Hongo *Pleurotus ostreatus* se tiene buenos resultados en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos, considerando el control del crecimiento propio del micelio del hongo, las condiciones de nutrientes, oxigenación, humedad, y temperatura.

DÉLEY R. utilizó la técnica de biorremediación con *Pleurotus ostreatus* var. *Florida* en suelos del oriente ecuatoriano contaminados con hidrocarburos, inoculándolo con sustratos sólidos obteniendo porcentajes de eficiencia entre 94-97 % en TPH en dos meses, semejantes a las obtenidas en sustratos líquidos realizadas en la presente investigación.

Tabla XVI: Eficiencia TPH's

% de Eficiencia TPH's	
T1 U1	90,1
T1 U2	88,1
T1 U3	92,1
T1 B	42,9
T2 U1	90,5
T2 U2	87,2
T2 U3	97,3
T2 B	92,4

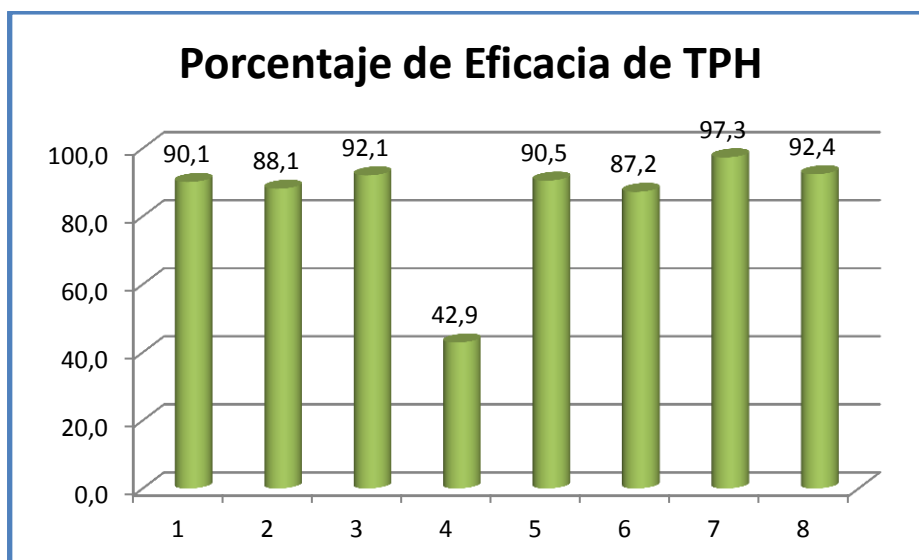


Gráfico 11. Porcentaje de Eficacia en la biodegradación del parámetro TPH

Se hace un análisis estadístico haciendo una comparación de medias de grupos pareados es decir comparando la variación de resultados antes del tratamiento y luego de analizando cada tratamiento donde se puede deducir como se puede observar en la Figura 13. Donde se indica que el nivel de significación establecido es menor a 0,05 en el Tratamiento 1; es decir las medias son diferentes lo que nos indica que en el tratamiento 1 existe menor dispersión de datos, sin embargo el Tratamiento 2 aunque presenta mayor heterogeneidad de datos se evidencia mayor eficacia de biodegradación.

Se rechaza la hipótesis nula aceptando la hipótesis alternativa que indica que el hongo *Pleurotus ostreatus* es efectivo para la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados utilizando inóculo líquido y avena como sustrato, tanto en suelos autoclavados (T1) y no autoclavados (T2).

Estadísticos para la variable TPH INICIAL T1-TPH FINAL T1
=====

Estadístico	TPH INICIAL T1-TPH FINAL T1
N	4
Media	16093.4850
Mediana	19335.7700
Moda	2384.4600
Media Geométrica	11985.7114
Varianza	8.8851E7
Desviación Típica	9426.1201
E.E. de la Media (*)	4713.0600
Mínimo	2384.4600
Máximo	23317.9400
Coefficiente de Variación	58.5710

Estadísticos para la variable TPH INICIAL T2-TPH FINAL T2
=====

Estadístico	TPH INICIAL T2-TPH FINAL T2
N	4
Media	21541.9675
Mediana	19931.4950
Moda	6874.4700
Media Geométrica	16400.4764
Varianza	2.6701E8
Desviación Típica	16340.5403
E.E. de la Media (*)	8170.2701
Mínimo	6874.4700
Máximo	39430.4100
Coefficiente de Variación	75.8544

Figura 12. Análisis estadístico para T1 y T2

Estimación y Contraste de Una Media Poblacional para TPH INICIAL T1 menos TPH FINAL T1

Tamaño Muestral: 4
Media: 16093.4850

Estimación

I.C. al 95.00% para la media: 16093.4850 +/- 14998.9644 [1094.5206, 31092.4494]

t-Student

Hipótesis Nula: media = 0.0000
Hipótesis Alternativa: no igual
Estadístico de contraste t: 3.4147
p-valor: 0.0420

Estimación y Contraste de Una Media Poblacional para TPH INICIAL T2 menos TPH FINAL T2

Tamaño Muestral: 4
Media: 21541.9675

Estimación

I.C. al 95.00% para la media: 21541.9675 +/- 26001.2794 [-4459.3119, 47543.2469]

t-Student

Hipótesis Nula: media = 0.0000
Hipótesis Alternativa: no igual
Estadístico de contraste t: 2.6366
p-valor: 0.0779

Figura 13. Nivel de Confianza al 95 % en análisis de tratamientos para TPH

4.7.2 HAP's

Los valores de HAP's en los suelos contaminados de las unidades experimentales son bajos y se encuentran dentro de los límites de control para suelos agrícolas a excepción del tratamiento T2U3 con 2,18 mg/kg.

El porcentaje de eficiencia en HAP's va desde el 48,3 % al 86,2% como se observa en la Tabla XVII y Grafico 15.

Tabla XVII: Eficiencia HAP's

% de Eficiencia HAP	
T1 U1	76,0
T1 U2	48,3
T1 U3	61,0
T1B	0
T2 U1	0
T2 U2	0
T2 U3	80,0
T2B	86,2

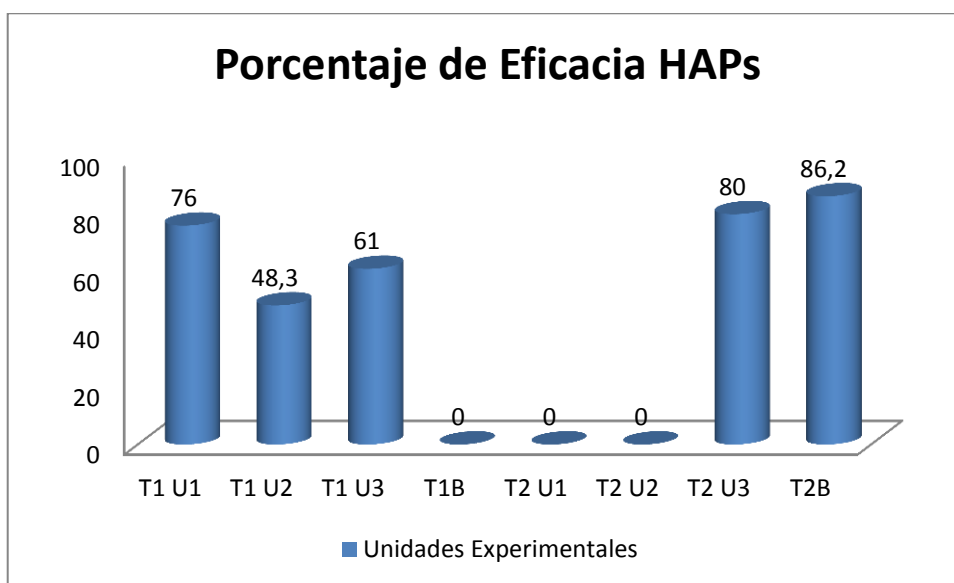


Gráfico 12: Variación de HAP's en las unidades experimentales

No se calculó Eficiencia en las unidades T1B, T2U1 y T2U2 porque desde el inicio de la investigación los valores se encuentran por debajo del límite de detección del equipo de Cromatografía Líquida de Alta Presión.

4.7.3 METALES PESADOS

CADMIO

En el Gráfico 16 se observa que los valores de Cadmio sufren un ligero incremento sin estar fuera de los límites permisibles de control de la RAOHE, estos valores aumentaron por la falta de homogeneidad del suelo al momento de realizar el muestreo y porque los suelos presentan crudo intemperizado en forma de grumos.

AL final del proceso de biorremediación en las unidades T2U1 y T2U2 el metal Cadmio se encuentran dentro de norma.

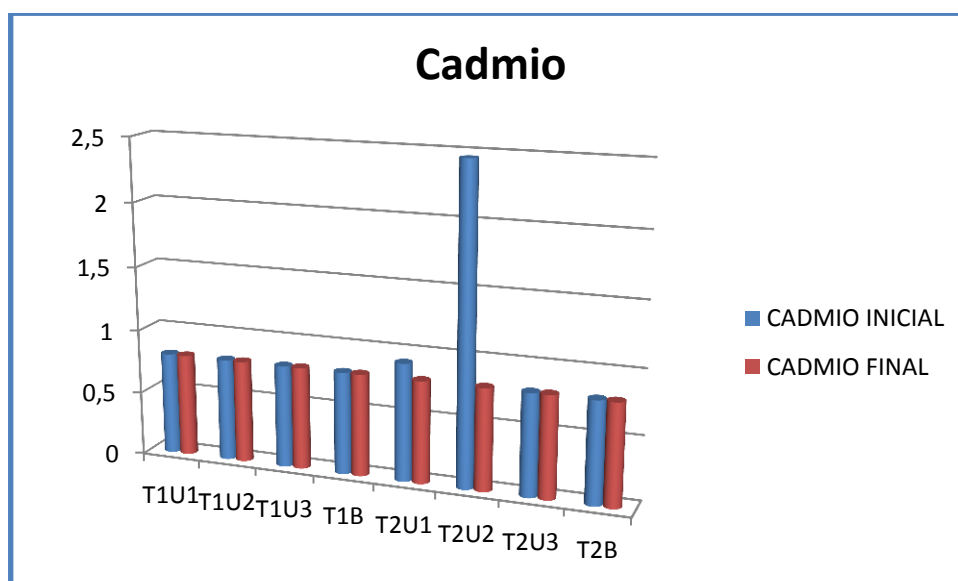


Gráfico 13: Variación de Cadmio en unidades experimentales

NIQUEL Y PLOMO

Los valores de Níquel y Plomo en todas las unidades experimentales desde el inicio de la investigación se encuentran dentro del límite de control, pero se decidió seguirlos analizando ya que son parámetros de control que especifica la norma para su disposición final.

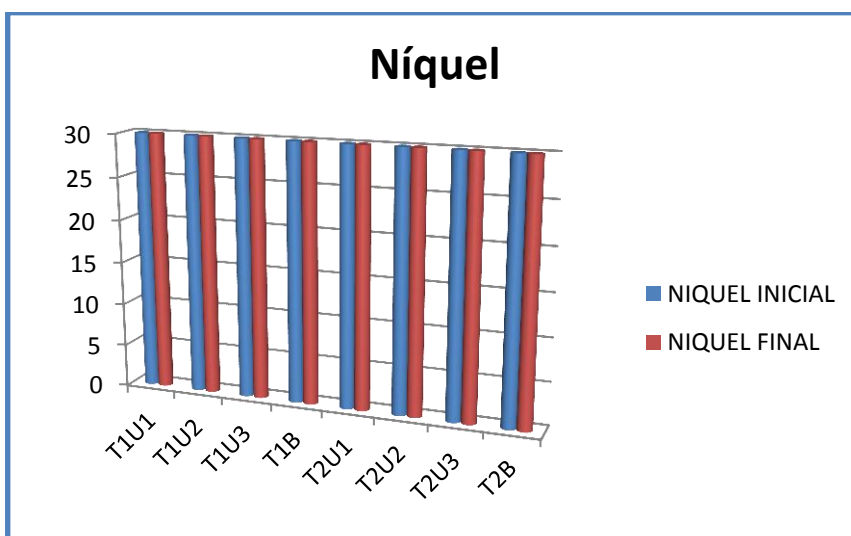


Gráfico 14: Variación de Níquel en las unidades experimentales

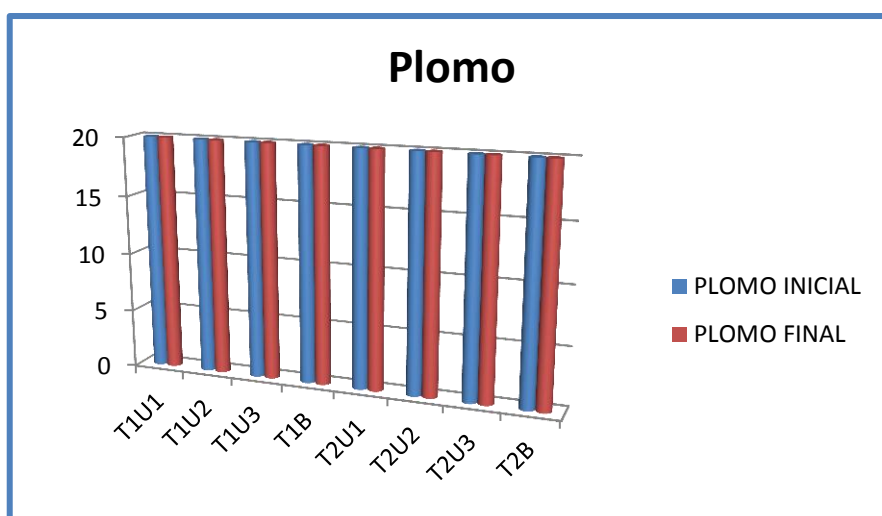


Gráfico 15: Variación de Plomo en las Unidades experimentales

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

- El crecimiento de hongo *Pleurotus ostreatus* en inoculo líquido y sustrato “Avena” biodegrada suelos contaminados por hidrocarburos con una eficacia comprendida entre el 88% al 97% por lo cual esta técnica es viable para procesos de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos.
- Se formuló 9 sustratos líquidos con características y composición diferente donde se desarrolló el hongo *Pleurotus ostreatus*, concluyendo que el sustrato AVENA (A) es el mejor por presentar un buen crecimiento micelial (25,9673 g/L), el tiempo de residencia o cultivo fue bajo (6 días), buenas características de los pellets, buen consumo de sustrato presentándose el cultivo claro y transparente.
- Los suelos presentan alta concentración de Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPH 42681,16 mg/Kg) en la unidad experimental T2B y con la utilización de

micelio de *Pleurotus ostreatus* estos valores descienden a (857,41 mg/Kg) por debajo del límite de control para la disposición final en suelos agrícolas.

- La utilización del hongo *Pleurotus ostreatus* no presenta alta eficacia en los procesos de biorremediación de HAP's (86.2 %) y metales pesados Cd, (67%). En los metales Ni y Pb no se midió la eficacia ya que los valores de estos parámetros se encontraron dentro de los límites permisibles.
- Los resultados del proceso de remediación de Hidrocarburos Totales de Petróleo aplicando el micelio de hongo *Pleurotus ostreatus* en un lapso de tiempo correspondiente a tres meses aplicando autoclavado al suelo (T1) y no autoclavado (T2), produjeron altos porcentajes de eficiencia en biorremediación (hasta 97%), por lo que se concluye que el *Pleurotus ostreatus* es un organismos útil para procesos de descontaminación de suelos contaminados por hidrocarburos.

RECOMENDACIONES

- Para el cultivo en medio líquido del Hongo se recomienda que el sustrato utilizados sea blando para que el micelio tenga un buen agarre en los posibles grumos que se forman que tenga contenido de carbono y nutrientes suficiente para que el crecimiento sea óptimo.
- Se recomienda esterilizar el sustrato líquido lo más pronto posible para evitar la fermentación del mismo y perder de esta manera la estabilidad del pH, también se recomienda inocular el sustrato líquido inmediatamente después del proceso de esterilización para evitar la contaminación con agentes extraños.
- Se debe proveer de una buena agitación al inóculo durante el periodo de cultivo del hongo para evitar que se produzca un crecimiento únicamente superficial.
- Se recomienda la aplicación de inóculos líquidos por ser un método en el cual el Hongo Probado *Pleurotus ostreatus* tiene una mayor capacidad de superficie que dependiendo del sustrato y acondicionamiento del suelo se desarrolla y actúa como agente biológico eficiente para procesos de biorremediación.

- Se debe realizar una correcta homogenización del suelo a tratar para que el micelio del Hongo se distribuya y actúe de una forma más amplia, sin perder la apariencia esponjosa del micelio teniendo en cuenta que la finalidad no es obtener cuerpos fructíferos para que sea menor el tiempo de adaptación al suelo, de presentarse esta situación dichos cuerpos deben ser retirados.
- Se recomienda el uso de *Pleurotus ostreatus* en procesos de remediación por ser un Hongo fácil de manipular, no patógeno y que presenta altos porcentajes de eficiencia en la disminución de la concentración de contaminantes peligrosos como los TPH's.

BIBLIOGRAFÍA

1. **MORENO, M.**, Tratamientos biológicos de suelos contaminados: contaminación por hidrocarburos. Aplicación de hongos en tratamientos de biorrecuperación., Dpto Microbiología Molecular., Madrid., España., Pp 103-118.
2. **RODRIGUEZ, S., FERNANDEZ, M., BERMUDEZ, R.**, Tratamiento de efluentes industriales coloreados con *Pleurotus* spp., Centro de Estudios de Biotecnología Industrial., Santiago de Cuba, Cuba., 2003., Pp 164-168.
3. **SANCHEZ, J.**, Fundamentos y aspectos microbiológicos BIORREMEDIACIÓN., Universidad de Oviedo., Oviedo., España., 2010., Pp 12-15.
4. **ECUADOR, SUBSECRETARÍA DE PROTECCIÓN AMBIENTAL DEL MINISTERIO DE ENERGÍA Y MINAS**, Reglamento Sustitutivo del Reglamento Ambiental para las Operaciones Hidrocarburíferas en el Ecuador., Decreto No. 1215, publicado en el Registro Oficial No. 265 de 13 de Febrero de 2001., Quito., Ecuador., Pp 57
5. **AGUILAR, L.**, Producción de inóculo líquido para el cultivo de *Pleurotus* spp., Instituto Politécnico Nacional., Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología., Ciencias en Bioprocesos., México DF., México., **TESIS.**, 2007., Pp 78.

6. **GACURA, M.**, Effect of *Pleurotus ostreatus* on Bioremediation of PAH Contaminated River Sediment., Youngstown State University., Ciencias Biológicas., Youngstown., Estados Unidos de América., **TESIS**, 2009., Pp 49.

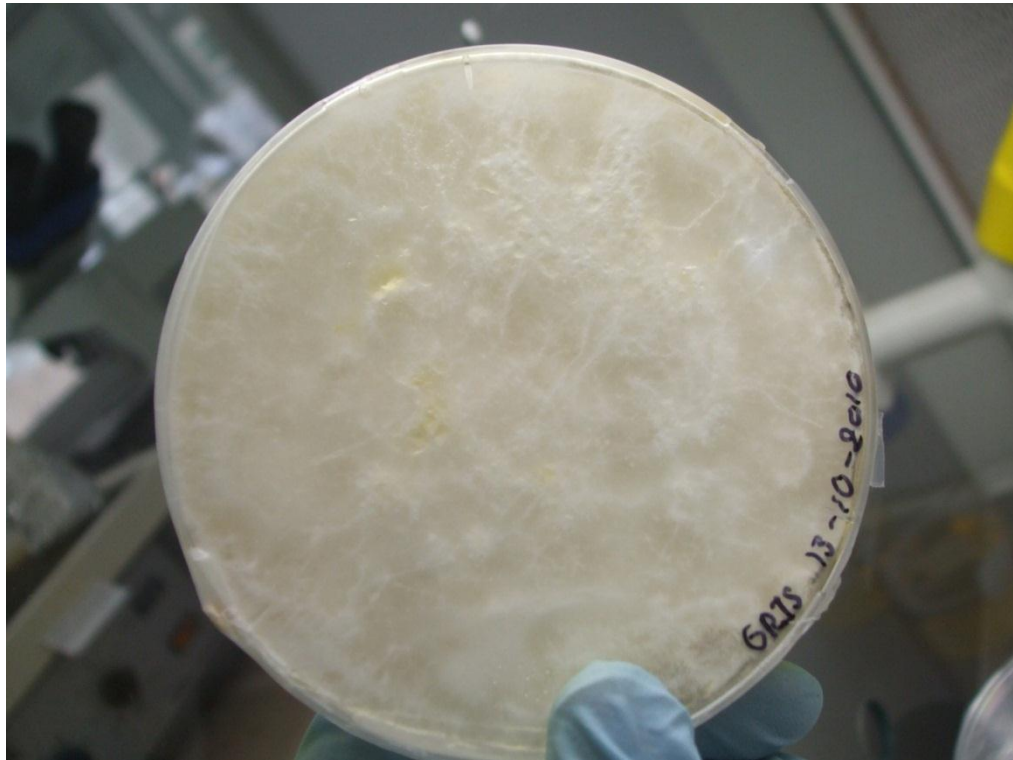
7. **OROSCO, V., SORIA, M.**, BIORREMEDIACIÓN DE VEGETACIÓN CONTAMINADA CON PETROLEO POR DERRAMES EN EL CAMPAMENTO GUARUMO-PETROPRODUCCIÓN., Escuela Superior Politécnica de Chimborazo., Facultad de Ciencias., Escuela de Ciencias Químicas., Ingeniería en Biotecnología Ambiental., Riobamba., Ecuador., **TESIS**., 2008., Pp 24-25.

8. **RODRIGUEZ, K.**, Eficacia del Hongo *Pleurotus ostreatus* como biorremediador de suelos contaminados con metales pesados., Ciencias en Biología., Mayagües., Puerto Rico **TESIS**., 2005., 34 p.

9. **ROSALES, L.**, BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS sCONTAMINADOS CON ACEITE DE AUTOMÓVIL CON EL 2HONGO DE PUDRICIÓN BLANCA PLEUROTUS OSTREATUS 2(SETAS) EN DURANGO., Instituto Politécnico Nacional., Unidad 2Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología., Ciencias en Gestión 2Ambiental., México DF., México., **TESIS**., 2008., Pp 97

ANEXOS

Anexo 1: Caja Petri con Cultivo Puro de *Pleurotus ostreatus*



Anexo 2: Preparación y pesaje de los sustratos



Anexo 3: Esterilización de los sustratos



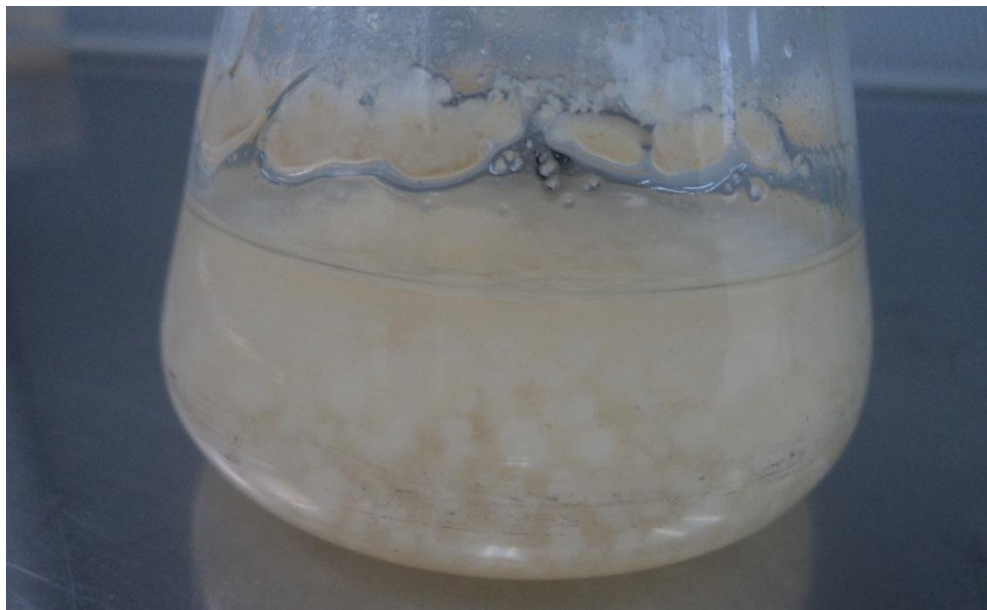
Anexo 4: Inoculación de medio sólido para preparar inóculo líquido



Anexo 5: Agitación de los sustratos con *Pleurotus ostreatus*



Anexo 6: Pellets observados en los sustratos líquidos



Anexo 7: Filtración de los pellets para medición de biomasa



Anexo 8: Prueba de antagonismo *Pleurotus ostreatus* con otros microorganismos



Anexo 9: Disposición de las cubetas en el área destinada para el tratamiento



Anexo 10: Suelo autoclavado listo para ser dispuesto en las unidades experimentales



Anexo 11: Pesaje de los suelos en las cubetas (Unidades experimentales)



Anexo 12: Disposición de los suelos en las cubetas en el lugar experimental



Anexo 13: Tratamiento 1 con sus réplicas y blanco



Anexo 14: Tratamiento 1; réplicas y blanco luego de transcurrido un tiempo del tratamiento



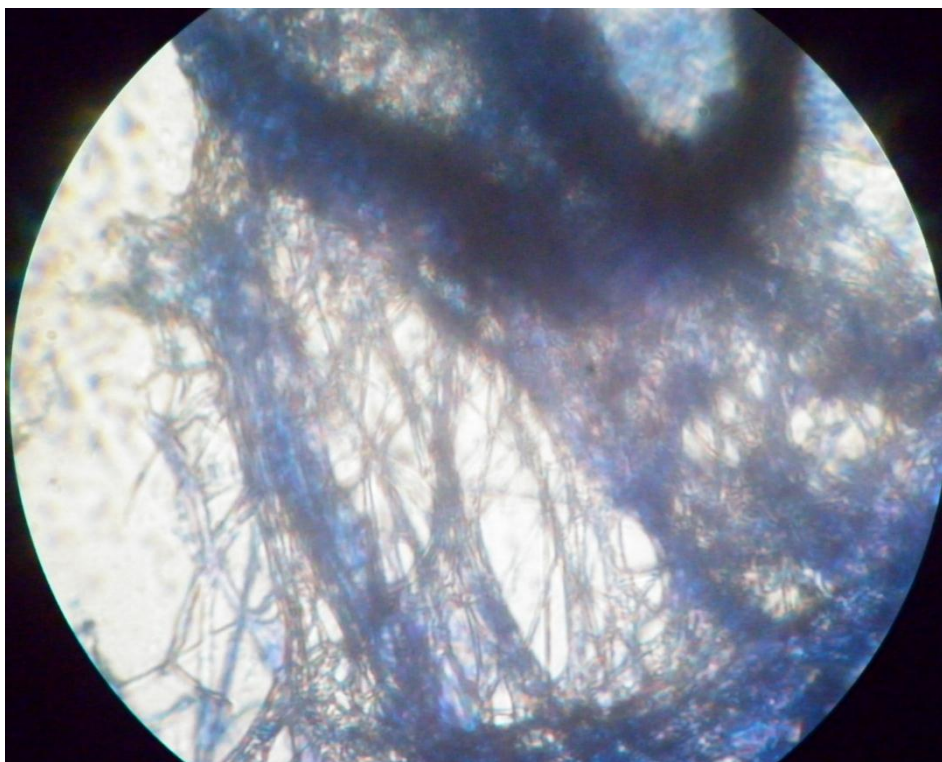
Anexo 15: Tratamiento 2 con sus réplicas y blanco



Anexo 16: Tratamiento 2; réplicas y blanco luego de transcurrido un tiempo del tratamiento



Anexo 17: *Pleurotus ostreatus* visto al microscopio (Micelio)





Anexo 18: Muestras tomadas del Tratamiento 1 y su codificación



Anexo 19: Muestras tomadas del Tratamiento 2 y su codificación



Anexo 20: Resultados de Análisis de Laboratorio

 <p>LABORATORIO DE ANÁLISIS AMBIENTAL E INSPECCIÓN LAB-CESTTA</p>	<p>ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO</p> <p>CENTRO DE SERVICIOS TÉCNICOS Y TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA AMBIENTAL</p> <p>FACULTAD DE CIENCIAS Panamericana Sur Km. 1 ½ Teléfono: (03) 2 998232 RIOBAMBA - ECUADOR</p>	 <p>ENSAYOS No. OAE LE 2C 06-008</p>
---	---	---

INFORME DE ENSAYO No.
ST:

1841
11 - 0280 ANÁLISIS DE SUELOS

Nombre Peticionario:
Atn.
Dirección:

CESTTA
Dra. Nancy Veloz
Panamericana Sur Km 1 ½

FECHA:
NUMERO DE MUESTRAS:
FECHA Y HORA DE RECEPCIÓN EN LAB:
FECHA DE MUESTREO:
FECHA DE ANÁLISIS:
TIPO DE MUESTRA:
CÓDIGO LAB-CESTTA:
CÓDIGO DE LA EMPRESA:
PUNTO DE MUESTRA:
ANÁLISIS SOLICITADO:
PERSONA QUE TOMA LA MUESTRA:
CONDICIONES AMBIENTALES DE ANÁLISIS:

15 de Septiembre 2011
2011/09/15 - 16:00
2011/09/15 - 14:00
2011/09/15 - 2011/09/15
SUELOS
B-S-11
CESTTA
CESTTA BETA 1 ESTERIL
Ta. 16 RAOHE
Sr. Cristian Chuquin
máx.: 24.0 °C. T mín.: 20.0°C

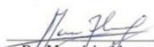
RESULTADOS ANALÍTICOS:

PARÁMETROS	METODO /NORMA	UNIDAD	RESULTADO	VALOR LÍMITE PERMISIBLE	INCERTIDUMBRE (k=2)
Hidrocarburos totales	PEE/LAB/CESTTA/26 TNRCC 1005	mg/kg	23282,91	-	±4%
Hidrocarburos aromáticos policíclicos	PEE/LAB/CESTTA/23 EPA SW-846 No.8310 EPA SW-846 No.3540	mg/kg	1,25	-	± 15%
Cadmio	PEE/LAB/CESTTA/76 EPA SW-846 No. 3050B, 7130	mg/kg	<0,8	-	± 38%
Níquel	PEE/LAB/CESTTA/77 EPA SW-846 No. 3050B, 7520	mg/kg	<30	-	± 30%
Plomo	PEE/LAB/CESTTA/78 EPA SW-846 No. 3050B, 7420	mg/kg	<20	-	± 38%


OBSERVACIONES:

- Muestra receptada en laboratorio.

RESPONSABLES DEL INFORME:




Dr. Mauricio Alvarez
RESPONSABLE TÉCNICO

LABORATORIO DE ANALISIS AMBIENTAL
E INSPECCION
LAB - CESTTA
ESPOCH


Dra. Nancy Veloz M.
JEFE DE LABORATORIO

Este documento no puede ser reproducido ni total ni parcialmente sin la aprobación escrita del laboratorio.
Los resultados arriba indicados sólo están relacionados con los objetos de ensayo
MC2201-05

Página 1 de 1

 <p>LABORATORIO DE ANÁLISIS AMBIENTAL E INSPECCIÓN LAB-CESTTA</p>	<p>ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO</p> <p>CENTRO DE SERVICIOS TÉCNICOS Y TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA AMBIENTAL</p> <p>FACULTAD DE CIENCIAS Panamericana Sur Km. 1 ½ Telefax: (03) 2998-232 Riobamba - Ecuador</p>	 <p>ENSAYOS No OAE LE 2C 06-008</p>
--	--	--

INFORME DE ENSAYO No.
ST:

2268
11 - 0350 ANÁLISIS DE SUELOS

Nombre Peticionario:
Atn.
Dirección:

CESTTA
Dra. Nancy Veloz
Panamericana Sur Km 1 ½

FECHA:
NUMERO DE MUESTRAS:
FECHA Y HORA DE RECEPCIÓN EN LAB:
FECHA DE MUESTREO:
FECHA DE ANÁLISIS:
TIPO DE MUESTRA:
CÓDIGO LAB-CESTTA:
CÓDIGO DE LA EMPRESA:
PUNTO DE MUESTRA:
ANÁLISIS SOLICITADO:
PERSONA QUE TOMA LA MUESTRA:
CONDICIONES AMBIENTALES DE ANÁLISIS:

05 de Diciembre de 2011
1
2011 / 11 / 28 - 14:30
2011 / 11 / 28 - 10:00
2011 / 11 / 28 - 2011 / 12 / 05
SUELO
LAB-S 3439-11
TPCIE
CESTTA CUBETA 1 ESTERIL
Tabla 6 RAOHE
Sr. Cristian Chuquin
T máx.: 24.0 °C. T mín.: 20.0°C

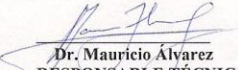
RESULTADOS ANALÍTICOS:

PARÁMETROS	MÉTODO /NORMA	UNIDAD	RESULTADO	LÍMITE PERMISIBLE	INCERTIDUMBRE (k=2)
Hidrocarburos totales	PEE/LAB/CESTTA/26 TNRCC 1005	mg	7878	-	±4%
Hidrocarburos aromáticos policíclicos	PEE/LAB/CESTTA/23 EPA SW-846 No. 310 EPA SW-846 No. 540	mg/kg	<0,3	-	± 30%
Cadmio	PEE/LAB/CESTTA/76 EPA SW-846 No. 3050B, 7130	mg/kg	<0,8	-	± 38%
Níquel	PEE/LAB/CESTTA/77 EPA SW-846 No. 3050B, 752	mg/kg	<30	-	± 30%
Plomo	PEE/LAB/CESTTA/78 EPA SW-846 No. 3050B, 7420	mg/kg	<20	-	± 38%

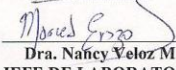
OBSERVACIONES:


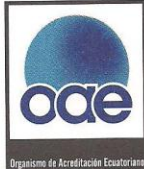
- Muestra receptada en laboratorio.

RESPONSABLES DEL INFORME:


Dr. Mauricio Álvarez
RESPONSABLE TÉCNICO

LABORATORIO DE ANÁLISIS AMBIENTAL
E INSPECCIÓN
LAB - CESTTA
ESPOCH


Dra. Nancy Veloz M.
JEFE DE LABORATORIO

 <p>ESPOCH LABORATORIO DE ANÁLISIS AMBIENTAL E INSPECCIÓN LAB-CESTTA</p>	<p>ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO</p> <p>CENTRO DE SERVICIOS TÉCNICOS Y TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA AMBIENTAL</p> <p>FACULTAD DE CIENCIAS Panamericana Sur Km. 1 ½ Teléfono: (03) 2 998232 RIOBAMBA - ECUADOR</p>	 <p>OAE Organismo de Acreditación Ecuatoriana</p> <p>ENSAYOS No. OAE LE 2C 06-008</p>
--	---	---

INFORME DE ENSAYO No. 1841
ST: 11 - 0280 ANÁLISIS DE SUELOS

Nombre Peticionario: CESTTA
Atn. Dra. Nancy Veloz
Dirección: Panamericana Sur Km 1 ½

FECHA: 15 de Septiembre de 2011
NUMERO DE MUESTRAS: 1
FECHA Y HORA DE RECEPCIÓN EN LAB: 2011 / 09 / 07 - 16:00
FECHA DE MUESTREO: 2011 / 09 / 05 - 14:00
FECHA DE ANÁLISIS: 2011 / 09 / 07 - 2011 / 09 / 15
TIPO DE MUESTRA: SUELO
CÓDIGO LAB-CESTTA: LAB-S 2741-11
CÓDIGO DE LA EMPRESA: TPC2E
PUNTO DE MUESTRA: CESTTA CUBETA 2 ES
ANÁLISIS SOLICITADO: Tabla 6 MOHE
PERSONA QUE TOMA LA MUESTRA: Cristóbal Chuquín
CONDICIONES AMBIENTALES DE ANÁLISIS: T_{amb}: 24,0°C, T_m: 20,0°C


RESULTADOS ANALÍTICOS:

PARÁMETROS	MÉTODO / NORMA	UNIDAD	RESULTADO	VALOR LÍMITE PERMISIBLE	INCERTIDUMBRE (k=2)
Hidrocarburos totales	PEE/LAB/CESTTA/36 TNRCC 1005	mg/kg	20088,83	-	±4%
Hidrocarburos aromáticos policíclicos	PEE/LAB/CESTTA/23 EPA SW-846 No.8310 EPA No.3540	mg/kg	0,58	-	± 15%
Cadmio	PEE/LAB/CESTTA/76 EPA SW-846 No. 3050B, 7130	mg/kg	<0,8	-	± 38%
Níquel	PEE/LAB/CESTTA/77 EPA SW-846 No. 3050B, 7520	mg/kg	<30	-	± 30%
Plomo	PEE/LAB/CESTTA/78 EPA SW-846 No. 3050B, 7420	mg/kg	<20	-	± 38%

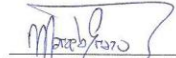
OBSERVACIONES:



- Muestra receptada en laboratorio.

RESPONSABLES DEL INFORME:


Dr. Mauricio Alvarez
RESPONSABLE TÉCNICO

LABORATORIO DE ANALISIS AMBIENTAL
E INSPECCION
LAB - CESTTA
ESPOCH


Dra. Nancy Veloz M.
JEFE DE LABORATORIO

 <p>LABORATORIO DE ANÁLISIS AMBIENTAL E INSPECCIÓN LAB-CESTTA</p>	<p>ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO</p> <p>CENTRO DE SERVICIOS TÉCNICOS Y TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA AMBIENTAL</p> <p>FACULTAD DE CIENCIAS Panamericana Sur Km. 1 ½ Telefax: (03) 2998-232 Riobamba - Ecuador</p>	 <p>ENSAYOS No OAE LE 2C 06-008</p>
--	--	--

INFORME DE ENSAYO No. ST: 2268
11 – 0350 ANÁLISIS DE SUELOS

Nombre Peticionario: CESTTA
Atn. Dra. Nancy Veloz
Dirección: Panamericana Sur Km 1 ½

FECHA: 05 de Diciembre de 2011
NUMERO DE MUESTRAS: 1
FECHA Y HORA DE RECEPCIÓN EN LAB: 2011 / 11 / 28 – 14:30
FECHA DE MUESTREO: 2011 / 11 / 28 – 10:05
FECHA DE ANÁLISIS: 2011 / 11 / 28 - 2011 / 12 / 05
TIPO DE MUESTRA: SUELO
CÓDIGO LAB-CESTTA: LAB-S 3440-11
CÓDIGO DE LA EMPRESA: TPC2E
PUNTO DE MUESTRA: CESTTA CUBETA 2 ESTERIL
ANÁLISIS SOLICITADO: Tabla 6 RAOHE
PERSONA QUE TOMA LA MUESTRA: Sr. Cristian Chiquin
CONDICIONES AMBIENTALES DE ANÁLISIS: T máx.: 24 °C T mín.: 10.0 °C

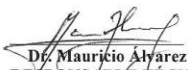
RESULTADOS ANALÍTICOS:

PARÁMETROS	MÉTODO /NORMA	UNIDAD	RESULTADO	VALOR LÍMITE PERMISIBLE	INCERTIDUMBRE (k=2)
Hidrocarburos totales	PEE/LAB/CESTTA/76 TPC2E 10-5	mg/kg	324,78	-	±4%
Hidrocarburos aromáticos policíclicos	PEE/LAB/CESTTA/77 EPA SW-846 No.8310 EPA SW-846 No.3546	mg/kg	<0,3	-	± 30%
Cadmio	PEE/LAB/CESTTA/77 EPA SW-846 No. 3050B, 7520	mg/kg	<0,8	-	± 38%
Níquel	PEE/LAB/CESTTA/77 EPA SW-846 No. 3050B, 7520	mg/kg	<30	-	± 30%
Plomo	PEE/LAB/CESTTA/78 EPA SW-846 No. 3050B, 7420	mg/kg	<20	-	± 38%

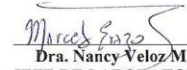
OBSERVACIONES:



- Muestra receptada en laboratorio.

RESPONSABLES DEL INFORME:


Dr. Mauricio Álvarez
RESPONSABLE TÉCNICO

LABORATORIO DE ANÁLISIS AMBIENTAL
E INSPECCIÓN
LAB - CESTTA
ESPOCH


Dra. Nancy Veloz M.
JEFE DE LABORATORIO

 <p>LABORATORIO DE ANÁLISIS AMBIENTAL E INSPECCIÓN LAB-CESTTA</p>	<p>ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO</p> <p>CENTRO DE SERVICIOS TÉCNICOS Y TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA AMBIENTAL</p> <p>FACULTAD DE CIENCIAS Panamericana Sur Km. 1 ½ Teléfono: (03) 2 998232 RIOBAMBA - ECUADOR</p>	 <p>ENSAYOS No. OAE LE 2C 06-008</p>
---	--	--

INFORME DE ENSAYO No. 1841
ST: 11 - 0280 ANÁLISIS DE SUELOS

Nombre Peticionario: CESTTA
Atn. Dra. Nancy Veloz
Dirección: Panamericana Sur Km 1 ½

FECHA: 15 de Septiembre de 2011
NUMERO DE MUESTRAS: 1
FECHA Y HORA DE RECEPCIÓN EN LAB: 2011 / 09 / 07 - 16:00
FECHA DE MUESTREO: 2011 / 09 / 05 - 14:00
FECHA DE ANÁLISIS: 2011 / 09 / 07 - 2011 / 09 / 05
TIPO DE MUESTRA: SUELO
CÓDIGO LAB-CESTTA: LAB-S 2201
CÓDIGO DE LA EMPRESA: TPC3E
PUNTO DE MUESTRA: CUESTA SUBA 3 ESTERIL
ANÁLISIS SOLICITADO: 6 DHE
PERSONA QUE TOMA LA MUESTRA: Sr. Cristóbal Chuquibambilla
CONDICIONES AMBIENTALES DE ANÁLISIS: T_{amb} 24.0 °C. T_h 20.0 °C


RESULTADOS ANALÍTICOS

PARÁMETROS	MÉTODO (NORMA)	UNIDAD	RESULTADO	VALOR LÍMITE PERMISIBLE	INCERTIDUMBRE (k=2)
Hidrocarburos totales	PEE/LAB/CESTTA/75 TPC 1005	mg/kg	25329,16	-	±4%
Hidrocarburos aromáticos policíclicos	PEE/LAB/CESTTA/76 EPA SW-846 No.8310 EPA SW-846 No.3540	mg/kg	0,77	-	± 15%
Cadmio	PEE/LAB/CESTTA/76 EPA SW-846 No. 3050B, 7130	mg/kg	<0,8	-	± 38%
Níquel	PEE/LAB/CESTTA/77 EPA SW-846 No. 3050B, 7520	mg/kg	<30	-	± 30%
Plomo	PEE/LAB/CESTTA/78 EPA SW-846 No. 3050B, 7420	mg/kg	<20	-	± 38%

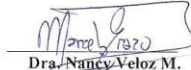
OBSERVACIONES:



- Muestra receptada en laboratorio.

RESPONSABLES DEL INFORME:


Dr. Mauricio Álvarez
RESPONSABLE TÉCNICO

LABORATORIO DE ANALISIS AMBIENTAL
E INSPECCION
LAB - CESTTA
ESPOCH


Dra. Nancy Veloz M.
JEFE DE LABORATORIO

 <p>LABORATORIO DE ANÁLISIS AMBIENTAL E INSPECCIÓN LAB-CESTTA</p>	<p>ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO</p> <p>CENTRO DE SERVICIOS TÉCNICOS Y TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA AMBIENTAL</p> <p>FACULTAD DE CIENCIAS Panamericana Sur Km. 1 ½ Teléfono: (03) 2 998232 RIOBAMBA - ECUADOR</p>	 <p>ENSAYOS No. OAE LE 2C 06-008</p>
---	--	--

INFORME DE ENSAYO No. ST:

1841
11 - 0280 ANÁLISIS DE SUELOS

Nombre Peticionario:
Atn.
Dirección:

CESTTA
Dra. Nancy Veloz
Panamericana Sur Km 1 ½

FECHA:
NUMERO DE MUESTRAS:
FECHA Y HORA DE RECEPCIÓN EN LAB:
FECHA DE MUESTREO:
FECHA DE ANÁLISIS:
TIPO DE MUESTRA:
CÓDIGO LAB-CESTTA:
CÓDIGO DE LA EMPRESA:
PUNTO DE MUESTRA:
ANÁLISIS SOLICITADO:
PERSONA QUE TOMA LA MUESTRA:
CONDICIONES AMBIENTALES DE ANÁLISIS:

15 de Septiembre de 2011
1
2011 / 09 / 07 - 16:00
2011 / 09 / 05 - 14:00
2011 / 09 / 07 - 2011 / 09 / 15
SUELO
LAB-S 2743-11
TPCBE
CESTTA CUBA BLANCO
Tabla SHE
S. Cristian Quin
T m 24.0 C. T m 20.0


RESULTADOS ANALÍTICOS:

PARÁMETROS	MÉTODO / NORMA	UNIDAD	RESULTADO	VALOR LÍMITE PERMISIBLE	INCERTIDUMBRE (k=2)
Hidrocarburos totales	PEE/LAB-CESTTA/26 TNC 1005	mg/kg	5554,73	-	±4%
Hidrocarburos aromáticos policíclicos	PEE/LAB-CESTTA/23 EPA SW-846 EPA SW-846 No.3540	mg/kg	<0,3	-	± 30%
Cadmio	PEE/LAB/CESTTA/76 EPA SW-846 No. 3050B, 7130	mg/kg	<0,8	-	± 38%
Níquel	PEE/LAB/CESTTA/77 EPA SW-846 No. 3050B, 7520	mg/kg	<30	-	± 30%
Plomo	PEE/LAB/CESTTA/78 EPA SW-846 No. 3050B, 7420	mg/kg	<20	-	± 38%

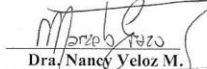
OBSERVACIONES:



- Muestra receptada en laboratorio.

RESPONSABLES DEL INFORME:


Dr. Mauricio Alvarez
RESPONSABLE TÉCNICO

LABORATORIO DE ANALISIS AMBIENTAL
E INSPECCION
LAB - CESTTA


Dra. Nancy Veloz M.
JEFE DE LABORATORIO

 <p>LABORATORIO DE ANÁLISIS AMBIENTAL E INSPECCIÓN LAB-CESTTA</p>	<p>ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO</p> <p>CENTRO DE SERVICIOS TÉCNICOS Y TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA AMBIENTAL</p> <p>FACULTAD DE CIENCIAS Panamericana Sur Km. 1 ½ Teléfono: (03) 2 998232 RIOBAMBA - ECUADOR</p>	 <p>ENSAYOS No. OAE LE 2C 06-008</p>
---	--	--

INFORME DE ENSAYO No. 1841
ST: 11 – 0280 ANÁLISIS DE SUELOS

Nombre Peticionario: CESTTA
Atn. Dra. Nancy Veloz
Dirección: Panamericana Sur Km 1 ½

FECHA: 15 de Septiembre de 2011
NUMERO DE MUESTRAS: 1
FECHA Y HORA DE RECEPCIÓN EN LAB: 2011 / 09 / 07 – 16:00
FECHA DE MUESTREO: 2011 / 09 / 05 – 14:00
FECHA DE ANÁLISIS: 2011 / 09 / 07 - 2011 / 09 / 15
TIPO DE MUESTRA: SUELO
CÓDIGO LAB-CESTTA: LAB-S 2744 (1)
CÓDIGO DE LA EMPRESA: TPCI
PUNTO DE MUESTRA: CESTTA CUENTA 1
ANÁLISIS SOLICITADO: COB, COH, COB, COH
PERSONA QUE TOMA LA MUESTRA: Cristóbal Chuquibambilla
CONDICIONES AMBIENTALES DE ANÁLISIS: T_{amb}: 20 °C, T_h: 20,0 °C

RESULTADOS ANALÍTICOS:

PARÁMETROS	MÉTODO NORMA	UNIDAD	RESULTADO	VALOR LÍMITE PERMISIBLE	INCERTIDUMBRE (k=2)
Hidrocarburos totales	PEE/LAB/CESTTA/25 TCC 1005	mg/kg	9407,07	-	±4%
Hidrocarburos aromáticos polícíclicos	PEE/LAB/CESTTA/23 EPA SW-846 No.8310 EPA SW-846 No.3540	mg/kg	<0,3	-	± 30%
Cadmio	PEE/LAB/CESTTA/76 EPA SW-846 No. 3050B, 7130	mg/kg	0,92	-	± 38%
Níquel	PEE/LAB/CESTTA/77 EPA SW-846 No. 3050B, 7520	mg/kg	<30	-	± 30%
Plomo	PEE/LAB/CESTTA/78 EPA SW-846 No. 3050B, 7420	mg/kg	<20	-	± 38%

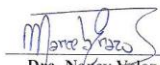
OBSERVACIONES:



- Muestra receptada en laboratorio.

RESPONSABLES DEL INFORME:


Dr. Mauricio Alvarez
RESPONSABLE TÉCNICO

LABORATORIO DE ANÁLISIS AMBIENTAL
E INSPECCIÓN
LAB - CESTTA
ESPOCH


Dra. Nancy Veloz M.
JEFE DE LABORATORIO

 <p>LABORATORIO DE ANÁLISIS AMBIENTAL E INSPECCIÓN LAB-CESTTA</p>	<p>ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO</p> <p>CENTRO DE SERVICIOS TÉCNICOS Y TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA AMBIENTAL</p> <p>FACULTAD DE CIENCIAS Panamericana Sur Km. 1 ½ Teléfono: (03) 2 998232 RIOBAMBA - ECUADOR</p>	 <p>ENSAYOS No. OAE LE 2C 06-008</p>
---	--	--

INFORME DE ENSAYO No.
ST:

1841
11 - 0280 ANÁLISIS DE SUELOS

Nombre Peticionario:
Atn.
Dirección:

CESTTA
Dra. Nancy Veloz
Panamericana Sur Km 1 ½

FECHA:
NUMERO DE MUESTRAS:
FECHA Y HORA DE RECEPCIÓN EN LAB:
FECHA DE MUESTREO:
FECHA DE ANÁLISIS:
TIPO DE MUESTRA:
CÓDIGO LAB-CESTTA:
CÓDIGO DE LA EMPRESA:
PUNTO DE MUESTRA
ANÁLISIS SOLICITADO:
PERSONA QUE TOMA LA MUESTRA:
CONDICIONES AMBIENTALES DE ANÁLISIS:

15 de Septiembre de 2011
1
2011 / 09 / 07 - 16:00
2011 / 09 / 05 - 14:00
2011 / 09 / 07 - 2011 / 09 / 15
SUELO
LAB-S 2745-11
TPC2
CESTTA CUBETA 2
Tabla 6 RAOHE
Sr. Cristian Chuquin
T máx.: 24.0 °C. T mín.: 20.0 °C


RESULTADOS ANALÍTICOS:

PARÁMETROS	MÉTODO /NORMA	UNIDAD	RESULTADO	VALOR LÍMITE PERMISIBLE	INCERTIDUMBRE (k=2)
Hidrocarburos totales	PEE/LAB/CESTTA/26 TNRCC 1005	mg/kg	7.15	-	±4%
Hidrocarburos aromáticos policíclicos	PEE/LAB/CESTTA/73 EPA SW-846 No. 3540	mg/kg	<0.3	-	± 30%
Cadmio	PEE/LAB/CESTTA/76 EPA SW-846 No. 3050B, 7130	mg/kg	2.46	-	± 21%
Níquel	PEE/LAB/CESTTA/77 EPA SW-846 No. 3050B, 7520	mg/kg	<30	-	± 30%
Plomo	PEE/LAB/CESTTA/78 EPA SW-846 No. 3050B, 7420	mg/kg	<20	-	± 38%

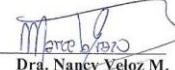
OBSERVACIONES:


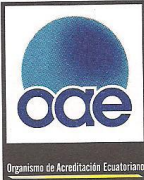
- Muestra receptada en laboratorio.

RESPONSABLES DEL INFORME:


Dr. Mauricio Alvarez
RESPONSABLE TÉCNICO

LABORATORIO DE ANÁLISIS AMBIENTAL
E INSPECCIÓN
LAB - CESTTA
ESPPOCH


Dra. Nancy Veloz M.
JEFE DE LABORATORIO

 <p>ESPOCH LABORATORIO DE ANÁLISIS AMBIENTAL E INSPECCIÓN LAB-CESTTA</p>	<p>ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO</p> <p>CENTRO DE SERVICIOS TÉCNICOS Y TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA AMBIENTAL</p> <p>FACULTAD DE CIENCIAS Panamericana Sur Km. 1 ½ Teléfono: (03) 2 998232 RIOBAMBA - ECUADOR</p>	 <p>ENSAYOS No. OAE LE 2C 06-008</p>
--	--	--

INFORME DE ENSAYO No. 1841
ST: 11 - 0280 ANÁLISIS DE SUELOS

Nombre Peticionario: CESTTA
Atm. Dra. Nancy Veloz
Dirección: Panamericana Sur Km 1 ½

FECHA: 15 de Septiembre de 2011
NUMERO DE MUESTRAS: 1
FECHA Y HORA DE RECEPCIÓN EN LAB: 2011 / 09 / 07 - 16:00
FECHA DE MUESTREO: 2011 / 09 / 05 - 14:00
FECHA DE ANÁLISIS: 2011 / 09 / 07 - 2011 / 09 / 15
TIPO DE MUESTRA: SUELO
CÓDIGO LAB-CESTTA: LAB-S 2746-11
CÓDIGO DE LA EMPRESA: TPC3
PUNTO DE MUESTRA: CESTTA CUBETA 3
ANÁLISIS SOLICITADO: Tabla 6 RAOHE
PERSONA QUE TOMA LA MUESTRA: Sr. Cristian Chuaqui
CONDICIONES AMBIENTALES DE ANÁLISIS: T máx.: 24,0 °C T mín.: 20 °C

RESULTADOS ANALÍTICOS:

PARÁMETROS	MÉTODO / NORMA	UNID.	RESULTADO	VALOR LÍMITE PERMISIBLE	INCERTIDUMBRE (k=2)
Hidrocarburos totales	PEE/LAB/CESTTA/24 TNR/21005	mg/kg	2206,45	-	±4%
Hidrocarburos aromáticos policíclicos	PEE/LAB/CESTTA/23 EPA SW-846 No.8310 EPA SW-846 No.3540	mg/kg	1,05	-	± 15%
Cadmio	PEE/LAB/CESTTA/76 EPA SW-846 No. 3050B, 7130	mg/kg	<0,8	-	± 38%
Níquel	PEE/LAB/CESTTA/77 EPA SW-846 No. 3050B, 7520	mg/kg	<30	-	± 30%
Plomo	PEE/LAB/CESTTA/78 EPA SW-846 No. 3050B, 7420	mg/kg	<20	-	± 38%


OBSERVACIONES:



- Muestra receptada en laboratorio.

RESPONSABLES DEL INFORME:


Dr. Mauricio Alvarez
RESPONSABLE TÉCNICO

LABORATORIO DE ANALISIS AMBIENTAL
E INSPECCION
LAB - CESTTA
ESPOCH


Dra. Nancy Veloz M.
JEFE DE LABORATORIO

 <p>LABORATORIO DE ANÁLISIS AMBIENTAL E INSPECCIÓN LAB-CESTTA</p>	<p>ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO</p> <p>CENTRO DE SERVICIOS TÉCNICOS Y TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA AMBIENTAL</p> <p>FACULTAD DE CIENCIAS Panamericana Sur Km. 1 ½ Teléfono: (03) 2 998232 RIOBAMBA - ECUADOR</p>	 <p>ENSAYOS No. OAE LE 2C 06-008</p>
---	--	--

INFORME DE ENSAYO No. ST:

1841
11 - 0280 ANÁLISIS DE SUELOS

Nombre Peticionario:
Atn.
Dirección:

CESTTA
Dra. Nancy Veloz
Panamericana Sur Km 1 ½

FECHA:
NUMERO DE MUESTRAS:
FECHA Y HORA DE RECEPCIÓN EN LAB:
FECHA DE MUESTREO:
FECHA DE ANÁLISIS:
TIPO DE MUESTRA:
CÓDIGO LAB-CESTTA:
CÓDIGO DE LA EMPRESA:
PUNTO DE MUESTRA:
ANÁLISIS SOLICITADO:
PERSONA QUE TOMA LA MUESTRA:
CONDICIONES AMBIENTALES DE ANÁLISIS:

15 de Septiembre de 2011
1
2011 / 09 / 07 - 16:00
2011 / 09 / 05 - 14:00
2011 / 09 / 07 - 2011 / 09 / 15
SUELO
LAB-S 2747-11
TPCB
CESTTA CUBETA BLANCO
Tabla 6 RAOHE
Sr. Cristian Quin
T_a 24.0 °C T_m 20.0 °C

RESULTADOS ANALÍTICOS:

PARÁMETROS	MÉTODO / NORMA	UNIDAD	RESULTADO	VALOR LÍMITE PERMISIBLE	INCERTIDUMBRE (k=2)
Hidrocarburos totales	PEE/LAB/CESTTA/26 TNM 1005	mg/kg	42681,16	-	±4%
Hidrocarburos aromáticos policíclicos	PEE/LAB/CESTTA/23 EPA SW-846 8310 EPA SW-846	mg/kg	2,18	-	±15%
Cadmio	PEE/LAB/CESTTA/76 EPA SW-846 No. 3050B, 7130	mg/kg	<0,8	-	±38%
Níquel	PEE/LAB/CESTTA/77 EPA SW-846 No. 3050B, 7520	mg/kg	<30	-	± 30%
Plomo	PEE/LAB/CESTTA/78 EPA SW-846 No. 3050B, 7420	mg/kg	<20	-	± 38%


OBSERVACIONES:

- Muestra receptada en laboratorio.

RESPONSABLES DEL INFORME:


Dr. Mauricio Álvarez
RESPONSABLE TÉCNICO

LABORATORIO DE ANÁLISIS AMBIENTAL
E INSPECCIÓN
LAB - CESTTA


Dra. Nancy Veloz M.
JEFE DE LABORATORIO

Anexo 21: Registro de Temperaturas durante el tratamiento del suelo.

Día	T1 U1	T1 U2	T1 U3	T1 B	T2 U1	T2 U2	T2 U3	T2 B
1	14,5	14,5	15	15,9	15,1	15	15,5	16
3	14,7	14,9	15,2	15,7	15,4	15,4	15,8	15,8
5	15,3	15,2	15,7	15,4	15,9	16	16,1	15,9
7	15,1	15	15,6	15,5	15,7	15,9	15,9	16
9	14,9	14,8	15,4	15,7	15,5	15,5	15,8	16
11	15,1	15	15,5	16,2	15,4	15,6	15,9	16,2
13	15,2	15,3	15,4	16,7	15,5	15,8	16,1	16,8
15	18,6	18,3	18	18,1	17,9	17,9	18,8	18,2
17	18,1	17,8	17,7	18	17,5	17,5	17,9	18,1
19	17	17	17,1	18,1	17,2	17,2	17,4	18
21	17,8	18,6	18,3	18,4	18,6	18,3	19,2	18,7
23	18,4	20,2	19,9	18,8	20,1	19,8	20,1	19,1
25	17,9	18,7	19,5	18,8	19,8	19,2	19,5	19,9
27	17,3	17,7	18,9	18,6	19,2	18,6	18,3	18,4
29	18,8	19,2	21	18,9	19,4	18,9	18,6	18,8
31	19,5	20	22	19,5	19,6	19	18,8	19
33	19	19,5	20	19	19,2	19	18,9	18,9
35	18,3	18,3	18,7	18,4	18,8	18,9	19	18,6
37	20,8	20,1	20	17,6	18,2	19,6	19,7	18
39	19,5	19	19,8	17,3	18	19	19,1	18
41	19,7	19,5	19,7	17,5	18,1	19,3	19,3	18,3
43	19,6	19,4	19,5	17,8	18,3	19,2	19,2	19,2
45	18,9	18,8	19	18	18,5	18,7	18,8	18,5
47	19	19,1	19,2	18,7	18,9	18,9	18,8	18,6
49	19,2	19,5	19,5	19	19	19,1	19	19
51	19,4	19,5	19,5	19,1	19,2	19,1	19,2	18,9
53	19,5	19,5	19,6	19,2	19,3	19,2	19,2	19
55	19,6	19,6	19,6	19,4	19,4	19,5	19,4	19,1
57	19,5	19,4	19,6	19,5	19,6	19	19,5	19
59	19,5	19	19,8	17,3	18	19	19,1	18
61	19,7	19,5	19,7	17,5	18,1	19,3	19,3	18,3
63	19,6	19,4	19,5	17,8	18,3	19,2	19,2	19,2
65	18,9	18,8	19	18	18,5	18,7	18,8	18,5
67	19	19,1	19,2	18,7	18,9	18,9	18,8	18,6
69	19,2	19,5	19,5	19	19	19,1	19	19
71	19,4	19,5	19,5	19,1	19,2	19,1	19,2	18,9
73	19,5	19,5	19,6	19,2	19,3	19,2	19,2	19

75	19,2	19,1	19,2	18,9	19,4	19,5	19,5	19,1
77	19,3	19,2	19,2	19	19,5	19,5	19,6	19,2
79	19,4	19,5	19,4	19,1	19,6	19,6	19,6	19,4
81	19,4	19,5	19,5	18,7	19,5	19,5	19	18,9
83	19,5	19,5	19,6	19	19,5	19,5	19,1	19
85	19,6	19,6	19,6	19,1	19,5	19,6	19,2	19,2
87	19,4	19,5	19,5	19,2	19,1	19,2	19,1	18,9
89	19,5	19,5	19,6	19,2	19,2	19,3	19,2	19
91	19,2	19,1	19,2	19,5	18,9	19,4	19,5	19,2
93	19	19,1	19,2	18,7	18,9	18,9	18,8	18,6
95	19,2	19,5	19,5	19	19	19,1	19	19
97	19,4	19,5	19,5	19,1	19,2	19,1	19,2	18,9
99	18,3	18,2	18,3	18	18,1	18,2	18,4	18,1

Anexo 22: Registro de humedades durante el tratamiento del suelo.

Día	T1 U1	T1 U2	T1 U3	T1 B	T2 U1	T2 U2	T2 U3	T2 B
1	32,33	33,15	33,12	32,58	29,98	30,19	31,25	31,56
4	38,25	38,15	39,24	38,96	37,54	37,27	37,45	37,54
8	37,33	37,31	37,45	37,59	37,25	37,14	37,04	37,05
12	40,04	40,09	40,12	40,15	38,98	38,68	38,95	38,76
16	41,42	41,23	42,05	42,15	40,23	40,19	40,27	40,58
20	42,56	42,24	42,98	42,57	41,51	41,25	41,13	41,19
24	41,96	41,56	41,58	41,23	41,57	41,78	41,98	41,96
28	41,69	41,85	41,65	41,87	41,32	41,89	41,67	41,31
32	42,01	42,11	42,15	42,09	41,05	41,16	41,12	41,17
36	41,23	41,57	41,78	41,67	41,31	41,24	41,98	41,57
40	41,87	41,32	41,89	42,12	41,17	41,56	41,58	41,23
44	41,57	41,78	41,98	41,96	41,96	41,56	41,58	41,23
48	41,32	41,89	41,67	41,31	41,69	41,85	41,65	41,87
52	42,05	42,16	42,12	42,17	41,01	41,11	41,15	41,09
56	42,94	42,98	42,91	42,89	41,88	41,86	41,95	41,91
60	42,54	42,46	42,49	42,51	41,53	41,56	41,48	41,57
64	42,18	42,24	42,27	42,31	42,35	42,22	42,18	42,19
68	42,19	42,18	42,2	42,21	42,18	42,11	42,1	42,16
72	37,29	37,25	37,59	37,41	37,65	37,52	37,99	37,84
76	38,54	38,61	38,95	38,78	38,17	38,26	38,59	38,89
80	39,94	39,91	39,98	39,96	39,44	39,68	39,79	39,88
84	40,17	40,15	40,13	40,12	40,04	40,09	40,08	40,02
88	41,09	41,27	41,38	41,04	40,87	40,97	40,17	40,58

92	45,16	45,32	45,36	45,21	44,12	43,27	43,18	44,09
96	43,51	43,65	43,57	43,47	43,16	43,19	43,23	43,34
100	42,68	42,55	43,1	43,34	41,51	41,03	41,12	41,67

Anexo 23: Análisis estadístico Biomasa, (Sustrato Tiempo) ANOVA dos factores

Anova Dos Factores. Estadísticos

Variable Respuesta: BIOMASA
Variable(s) Explicativa(s): SUSTRATO, TIEMPO
Número de Casos: 108

SUSTRATO		N	Media	Mediana	Varianza	Mínimo	Máximo	Coefficiente de Variación
AFRECHODEARROZ		12	4.7607	5.2405	5.7904	1.2570	7.8420	50.5459
AFRECHODEARROZEXTRACTODELEVADURA		12	12.3222	13.7885	14.6551	5.1370	16.1040	31.0675
EXTRACTODELEVADURA		12	2.1871	2.0955	0.8045	0.9820	3.4220	41.0119
AFRECHODETRIGOPANELA		12	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
AFRECHODETRIGOPANELAEXTRACTODELEVADURA		12	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
AVENAPANELA		12	23.0247	21.1270	66.3203	12.3430	35.6140	35.3694
ARROZDECEBADA		12	30.1662	27.0825	654.0122	1.0640	62.6420	84.7760
AFRECHODETRIGO		12	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
AVENA		12	25.8475	24.5545	32.8708	19.8710	33.9480	22.1813
Total		108	10.9231	3.4130	215.7299	0.0000	62.6420	134.4644

TIEMPO		N	Media	Mediana	Varianza	Mínimo	Máximo	Coefficiente de Variación
T4		27	15.2253	5.9510	394.6800	0.0000	62.6420	130.4839
T3		27	13.1419	5.2310	251.6887	0.0000	57.9130	120.7186
T2		27	9.5797	5.2500	117.7330	0.0000	35.4060	113.2653
T1		27	5.7457	1.2490	69.6664	0.0000	30.4570	145.2675
Total		108	10.9231	3.4130	215.7299	0.0000	62.6420	134.4644

Anexo 24: Interacción Sustrato – Tiempo sobre la biomasa

SUSTRATO TIEMPO	N	Media	Mediana	Varianza	Mínimo	Máximo	Coefficiente de Variación
AFRECHODEARROZ ,T4	3	5.2593	5.9510	8.9349	1.9850	7.8420	56.8348
AFRECHODEARROZ ,T3	3	4.8743	5.2310	7.8795	1.9060	7.4860	57.5883
AFRECHODEARROZ ,T2	3	4.8473	5.2500	7.6951	1.8940	7.3980	57.2275
AFRECHODEARROZ ,T1	3	4.0617	4.9150	6.2010	1.2570	6.0130	61.3094
AFRECHODETRIGO, T4	3	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
AFRECHODETRIGO, T3	3	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
AFRECHODETRIGO, T2	3	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
AFRECHODETRIGO, T1	3	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
AVENA, T4	3	26.4290	25.1040	48.3283	20.2350	33.9480	26.3039
AVENA, T3	3	26.3027	24.9750	49.6871	20.0120	33.9210	26.7992
AVENA, T2	3	25.9673	24.1340	51.2412	19.9040	33.8640	27.5666
AVENAPANELA, T4	3	26.1000	21.6750	67.9974	21.0110	35.6140	31.5941
AVENA, T1	3	24.6910	23.7450	28.6870	19.8710	30.4570	21.6922
AVENAPANELA, T3	3	25.9017	21.4280	69.0842	20.7850	35.4920	32.0894
AVENAPANELA, T2	3	25.7710	21.2430	69.7087	20.6640	35.4060	32.3976
AVENAPANELA, T1	3	14.3263	13.4170	6.5640	12.3430	17.2190	17.8834
AFRECHODEARROZEXTRACTODELEVADURA, T4	3	14.6823	14.3240	1.6401	13.6190	16.1040	8.7225
AFRECHODEARROZEXTRACTODELEVADURA, T3	3	14.2823	14.0120	0.9375	13.4780	15.3570	6.7792
AFRECHODEARROZEXTRACTODELEVADURA, T2	3	14.1620	13.9580	0.9073	13.3280	15.2000	6.7259
AFRECHODEARROZEXTRACTODELEVADURA, T1	3	6.1620	6.2140	1.0000	5.1370	7.1350	16.2287
AFRECHODETRIGOPANELA, T4	3	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
AFRECHODETRIGOPANELA, T3	3	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
AFRECHODETRIGOPANELA, T2	3	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
AFRECHODETRIGOPANELAEXTRACTODELEVADURA ,T4	3	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
AFRECHODETRIGOPANELA, T1	3	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
AFRECHODETRIGOPANELAEXTRACTODELEVADURA ,T3	3	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
AFRECHODETRIGOPANELAEXTRACTODELEVADURA ,T2	3	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
AFRECHODETRIGOPANELAEXTRACTODELEVADURA ,T1	3	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
EXTRACTODELEVADURA ,T4	3	3.0000	3.4040	0.5118	2.1740	3.4220	23.8465
EXTRACTODELEVADURA ,T3	3	2.6677	2.9810	0.3177	2.0170	3.0050	21.1279
EXTRACTODELEVADURA ,T2	3	2.0053	1.8450	0.3346	1.5240	2.6470	28.8438
ARROZDECEBADA, T4	3	61.5570	61.4370	1.0614	60.5920	62.6420	1.6737
EXTRACTODELEVADURA .T1	3	1.0753	1.0070	0.0198	0.9820	1.2370	13.0717
ARROZDECEBADA, T3	3	44.2483	38.9410	142.3680	35.8910	57.9130	26.9655
ARROZDECEBADA, T2	3	13.4643	11.7480	17.8237	10.3710	18.2740	31.3555
ARROZDECEBADA, T1	3	1.3950	1.2490	0.1792	1.0640	1.8720	30.3458
Total	108	10.9231	3.4130	215.7299	0.0000	62.6420	134.4644

Anexo 25: Comparaciones Múltiples LSD

Anova Dos Factores. Comparaciones Múltiples

Variable Respuesta: BIOMASA
Variable(s) Explicativa(s): SUSTRATO, TIEMPO
Número de Casos: 108

Modelo sin interacciones

con I.C. LSD al 95.0%

SUSTRATO	n	Media	Grupos Homogéneos
AFRECHODETRIGOPANELA	12	-0.0010E-11	X
AFRECHODETRIGOPANELAEXTRACTODELEVADURA	12	-0.0010E-11	X
AFRECHODETRIGO	12	0.0004E-11	X
EXTRACTODELEVADURA	12	2.1871	X
AFRECHODEARROZ	12	4.7607	X
AFRECHODEARROZEXTRACTODELEVADURA	12	12.3222	X
AVENAPANELA	12	23.0247	X
AVENA	12	25.8475	XX
ARROZDECEBADA	12	30.1662	X

Anexo 26: Comparaciones Múltiples HSD

Anova Dos Factores. Comparaciones Múltiples

Variable Respuesta: BIOMASA
Variable(s) Explicativa(s): SUSTRATO, TIEMPO
Número de Casos: 108

Modelo sin interacciones

con I.C. HSD de Tukey al 95.0%

SUSTRATO	n	Media	Grupos Homogéneos
AFRECHODETRIGOPANELA	12	-0.0010E-11	X
AFRECHODETRIGOPANELAEXTRACTODELEVADURA	12	-0.0010E-11	X
AFRECHODETRIGO	12	0.0004E-11	X
EXTRACTODELEVADURA	12	2.1871	X X
AFRECHODEARROZ	12	4.7607	X X
AFRECHODEARROZEXTRACTODELEVADURA	12	12.3222	X X
AVENAPANELA	12	23.0247	XX
AVENA	12	25.8475	X
ARROZDECEBADA	12	30.1662	X